300-301

FEB 17 1939

MEDICAL LIBRARY

BIOCHEMISCHE ZEITSCHRIFT

UNTER MITWIRKUNG
ZAHLREICHER FACHGENOSSEN

HERAUSGEGEBEN
VON
W. GRASSMANN
DRESDEN

300. BAND. 1. HEFT

AUSGEGEBEN AM 30. DEZEMBER 1938

BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1938

Die

Biochemische Zeitschrift

erscheint zwanglos in Heften, die in bunter Folge zu Bänden gesammelt, 3 volle Bände bilden einen Band. Der Preis des Bandes beträgt RM [illegible].—

In der Regel können Originalarbeiten nur aufgenommen werden, wenn sie nicht mehr als [illegible] Druckseiten umfassen. Die Verlagsbuchhandlung behält sich vor, Arbeiten, deren Umfang diesen Rahmen überschreitet, gegen Berechnung der Mehrkosten zum Satz zu bringen. Die Verfasser erhalten [illegible] Korrekturabzüge. — Jeder Arbeit ist ein kurzes Inhaltsreferat beizufügen, das nicht mehr als [illegible] Druckseiten umfassen darf. — Abbildungen, Tabellen und Formeln sind auf das notwendigste Maß zu beschränken. — Alle Manuskripte müssen [illegible] sein. Vor der Einsendung sind sie sorgfältig durchzusehen und auf Richtigkeit der Literaturzitate zu prüfen. Nachträgliche Änderungen sind nach Möglichkeit zu vermeiden.

Manuskriptsendungen sind an die Redaktion:

Herrn Prof. Dr. W. Grassmann, Berlin-Lichterfelde [illegible]

zu richten.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist vom Verfasser eine Bescheinigung des Direktors oder Abteilungsvorstehers beizubringen, daß er mit der Publikation der Arbeit [illegible] einverstanden ist und den Verfasser auf die Autorenbedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Autoren erhalten eine Honorierung. Sonderdrucke können gegen Berechnung geliefert werden, sind spätestens mit der Korrektur zurückzusenden. Bei Überschreitung der Frist, oder wenn [illegible] Korrekturen vorgenommen werden, die nicht vom Verfasser oder Redakteur veranlaßt sind, wird die Korrektur zum Ladenpreis berechnet. Bei Arbeiten, die [illegible] Abbildungen enthalten, wird die Korrektur nur geliefert, wenn [illegible] Abbildungen vorhanden sind. Andernfalls wird die Korrektur zum Ladenpreis berechnet.

Der Autor erhält einen Honorarbetrag von RM [illegible] für den Bogen, [illegible] Abbildungen, soweit sie [illegible] Tabelle RM [illegible] für diese Arbeit.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen für die Zeit [illegible] an den Verlag übergeht, und zwar bis zum [illegible]. Dasselbe umfaßt insbesondere das auf [illegible] Übersetzungsrecht. Hieraus ergibt sich, daß grundsätzlich nur Arbeiten angenommen werden können, [illegible] vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und daß es nicht zulässig ist, [illegible] zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 25 [illegible] unberechnet. Weitere [illegible] werden, falls bei Rücksendung der 1. Korrektur bestellt, gegen [illegible] geliefert. Darüber hinaus gewünschte Exemplare müssen [illegible] werden. [illegible] Exemplare [illegible] Autorenexemplaren beträgt sich die Verlagsbuchhandlung [illegible] Exemplare [illegible] den Satz zur Verfügung stehen. Anfertigung der [illegible] durch die Druckerei.

Verlagsbuchhandlung Julius Springer

Berlin W 9, Linkstraße [illegible].

---

300. Band — Inhaltsverzeichnis — 1. Heft

Seite

Brock, N., H. Boehncke und H. Herken. Untersuchungen über „Hydrolyse“ 1

Blocher, K., W. H. Fischer und H. Tschopp. Über die Wirkung steiger Konzentrationen des Testosterons 14

Lockner, Richard und Rudolf Hilf. Über die Anwendung der Tyndallerscheinung bei der kolloidchemischen Eiweißanalyse. II. Mitteilung: Anwendung der Tyndallerscheinung bei der Züchtung von Toxin allein in synthetischen und [illegible] Nährmedien 28

Beinazzo, N. T. und J. Pick. Über den Chlorophyllgehalt [illegible] Lösungsmittel und über Chlorophyllumlagerungen 37

Bednarczyk, Wl. und L. Marchlewski. Zur Kenntnis [illegible] Zucker. V. 53

Bednarczyk, Wl. und L. Marchlewski. Zur Kenntnis der Asche 65

Chalewiński, J. und L. Marchlewski. Absorptionsspektren [illegible] und Indigotin 68

Fink, Hermann und Sen. Krebs. Beiträge zur [illegible] der Hefe. III. Mitteilung: Beobachtungen [illegible] 79

Zeller, Alfred. Die Bestimmung von [illegible] mit Glucose mit dem Verfahren von Hagedorn und Jensen 75

Zeller, Alfred. Eine Nährlösung zur [illegible] von Mikroorganismen 82

Fink, Hermann und Felix Jehl. Zur Kenntnis der Toxin [illegible]. II. Mitteilung: Über die Zusammensetzung der Hefeschutzstoffe [illegible] 84

Untersuchungen über „Glykolyse"[1].

Von

N. Brock, H. Druckrey und H. Herken.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 10. November 1938.)

Mit 13 Abbildungen im Text.

I. Methodische Voruntersuchungen.

1.

Untersuchungen über den Gasstoffwechsel an *Gewebsschnitten* haben so lange nur einen beschränkten Wert, als ein Nachweis dafür fehlt, daß sich diese in vitro ähnlich verhalten wie das Gewebe, aus dem sie stammen, in vivo. Es unterliegt keinem Zweifel, daß ein Gewebe durch die Herausnahme aus dem Organismus, das Herstellen der Schnitte und die Übertragung in das unphysiologische Milieu einer „physiologischen" Salzlösung *geschädigt* wird. Aus diesem Grunde wurden sogar Zweifel darüber laut, ob Gewebsschnitte überhaupt als lebende Gewebe angesehen werden können. Andererseits ist der Vorteil, den die Untersuchung des Stoffwechsels eines isolierten Gewebes in einer indifferenten Nährlösung bietet, unabweisbar.

Solche Überlegungen veranlaßten uns, vor der Behandlung spezieller Probleme zunächst die Wirkung *unspezifischer* Schädigungen auf den Gewebsstoffwechsel zu untersuchen. Diese Versuche, über die wir ausführlich berichtet haben[2], ergaben, daß schädigende Eingriffe verschiedenster Art charakteristische Stoffwechselreaktionen auslösen, nämlich eine beträchtliche Atmungssteigerung und eine aerobe „Extrakohlensäure"-Bildung. Der beobachteten Wirkung scheint eine allgemeinere Bedeutung zuzukommen, denn sie ließ sich an recht verschiedenen Gewebs- und Zellarten in durchaus entsprechender Weise feststellen.

2.

Die zweite eingangs aufgestellte Frage, ob Gewebsschnitte in jeder Weise als lebende Gewebe anzusprechen sind, konnte im positiven Sinne experimentell klar beantwortet werden[3]. Schnitte von Warmblütergeweben, deren Funktion im wesentlichen parasympathischen

[1] Die Durchführung dieser Untersuchungen erfolgte mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. — [2] *H. Druckrey*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **180**, 231, 1936; *N. Brock, H. Druckrey* u. *H. Herken*, ebenda **188**, 436 u. 451, 1938. — [3] *N. Brock, H. Druckrey* u. *H. Herken*, ebenda z. Z. im Druck 1938.

Impulsen unterliegt, wie z. B. Speicheldrüsenschnitte (von Hund, Katze oder Ratte), reagieren in vitro auf eine durch Acetylcholinzusatz nachgeahmte physiologische Erregung mit einem charakteristischen Atmungsanstieg und einer aeroben Extrakohlensäurebildung (Abb. 1). Die Übereinstimmung zwischen diesem „Erregungsstoffwechsel" mit dem oben behandelten „Schädigungsstoffwechsel" hat uns an anderer Stelle beschäftigt[1].

Die Spezifität der Acetylcholinwirkung ergibt sich einmal aus der Wirksamkeit geringer Dosen, zum anderen daraus, daß der Stoffwechsel von Schnitten anderer Organe, die einer maßgeblichen parasympathischen Steuerung nicht unterliegen (z. B. Leber), durch Acetylcholin auch nicht in der charakteristischen Weise verändert wird; drittens wird die Acetylcholinwirkung durch Atropinzusatz aufgehoben (Abb. 1). Die Speicheldrüsenschnitte reagieren in vitro also ähnlich wie die Drüse in vivo. Damit ist der Nachweis erbracht, daß die Untersuchung des Stoffwechsels an Gewebsschnitten durchaus berechtigt ist und verwertbare Resultate liefert.

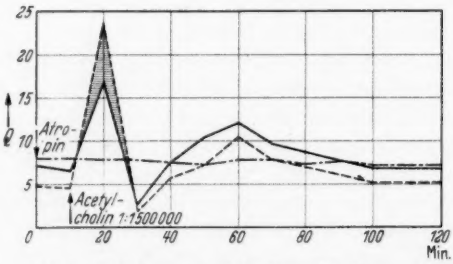


Abb. 1. Wirkung von Acetylcholin auf die Atmung von Gewebsschnitten der Speicheldrüse (die angegebene Dosis bezieht sich stets auf die Endkonzentration). Durchgezogene Linie: Sauerstoffaufnahme; gestrichelte Linie: CO_2-Bildung, sämtlich in cmm/mg Trockensubstanz/Stunde (Q). Das schraffierte Feld bezeichnet die „Extrakohlensäure"-Bildung. Strich-Punkt-Linie: Atmung vorher „atropinisierter" Schnitte; bleibt auf Acetylcholinzusatz unverändert.

3.

Nach diesen Ergebnissen lag es nahe, die Reaktionsfähigkeit des Speicheldrüsengewebes auf Acetylcholin als „Test" dafür zu benutzen, ob das Gewebe unter bestimmten Bedingungen noch als „normal" anzusprechen ist und in welchem Umfang das der Fall ist. Wir möchten hier als Beispiele den Einfluß des Sauerstoffmangels, der Temperatur und der Herstellung eines Gewebsbreies anführen, weil diese für physiologisch-chemische Untersuchungen besonders wichtig sein dürften.

Bei unseren Untersuchungen bedienten wir uns wieder der üblichen manometrischen Methoden in der von *Warburg* angegebenen Form[2]. In früheren Untersuchungen haben wir bereits festgestellt, daß besonders

[1] *N. Brock, H. Druckrey* u. *H. Herken*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. z. Z. im Druck 1938. — [2] *Otto Warburg*, „Über den Stoffwechsel der Tumoren", Berlin 1926; *Otto Warburg* u. *F. Kubowitz, W. Christian*, diese Zeitschr. **242**, 170, 1931.

parenchymatöse Warmblüterorgane durch Sauerstoffmangel schwer geschädigt werden[1]. Das gleiche ließ sich auch hier an der Speicheldrüse beobachten. Schnitte von einer Drüse, die über 3 Stunden bei 20° in Ringerlösung unter Sauerstoffmangel aufbewahrt waren, reagierten auf Acetylcholin nicht mehr, sie erwiesen sich vielmehr als tot. Anders lagen die Dinge, wenn die Drüse bei sonst gleichen Bedingungen im Eisschrank (+ 4°) gehalten wurde. Die Abb. 2 zeigt die Stoffwechsel-

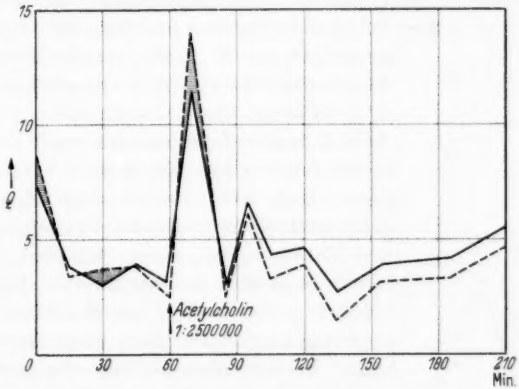


Abb. 2. Wirkung von Acetylcholin auf den Stoffwechsel von Speicheldrüsengewebe, das 24 Stunden bei Sauerstoffmangel auf Eis gelegen hatte. Erklärung wie in Abb. 1.

kurve von Schnitten einer solchen Drüse nach 24 Stunden Lagerung bei + 4°. Der Stoffwechsel liegt anfangs noch hoch, zeigt auch eine aerobe Extrakohlensäurebildung, wie es nach unseren Untersuchungen für „geschädigte" Gewebe charakteristisch ist. Bald gleichen sich diese Störungen jedoch spontan aus und auf Zusatz von Acetylcholin erfolgt dieselbe Stoffwechselreaktion wie bei einer frisch untersuchten Speicheldrüse. Kälte schädigt das Gewebe also nicht nur nicht, sondern verhindert sogar das Auftreten einer Schädigung durch Sauerstoffmangel. Das ist ohne weiteres verständlich, weil die unter anaeroben Bedingungen weiter verlaufenden Spaltungsvorgänge, bei denen „giftige" Zerfallsprodukte entstehen, als chemische Prozesse der *van 't Hoff*schen Regel folgen. Nach Aufbewahrung der Drüse über 2 Tage bei + 4° findet

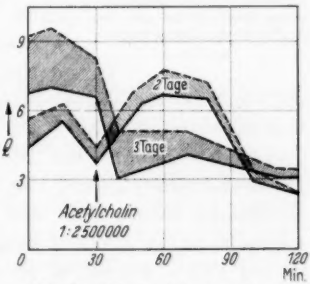


Abb. 3. Wie in Abb. 2 nach zwei- bzw. dreitägigem Lagern auf Eis.

[1] *H. Druckrey*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. **180**, 231, 1936.

sich eine kräftige aerobe Bildung fixer Säuren als Merkmal der eingetretenen Schädigung; dennoch ist meist noch eine gewisse Reaktionsfähigkeit auf Acetylcholin erhalten (Abb. 3). Nach 3 Tagen reagiert das Gewebe nicht mehr mit einer Stoffwechselsteigerung, obwohl der Grundstoffwechsel keineswegs unter den Normalwerten liegt. Findet bei der Aufbewahrung in der Kälte eine Kristallisation von Eis im Gewebe statt, so stirbt das Gewebe stets ab.

Anschließend haben wir die Reaktionsfähigkeit eines Speicheldrüsen*breies* auf Acetylcholinzusatz untersucht. Den Brei stellten wir uns mittels eines „Embryonenquetschers" her. Wurde schnell gearbeitet, so konnte eine Acetylcholinwirkung noch nachgewiesen werden (Abb. 4), andernfalls trat nur noch eine Stoffwechselsenkung auf. Wenn diese Versuche auch zeigen, daß das Gewebe seine Erregbarkeit selbst nach so tiefgreifenden Schädigungen, wie dem Zerquetschen, noch behalten *kann*, so unterliegt es doch keinem Zweifel, daß ein Gewebsbrei völlig anders zu beurteilen ist, wie sorgfältig hergestellte Gewebsschnitte und nur höchst bedingt noch als lebendes Gewebe angesprochen werden kann.

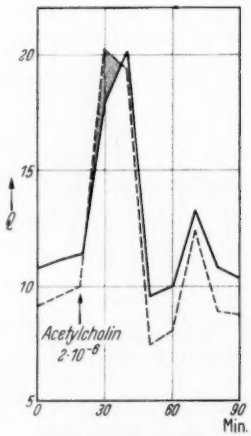


Abb. 4. Wirkung von Acetylcholin auf den Stoffwechsel eines Gewebsbreies aus der Speicheldrüse. Erklärung wie in Abb. 1.

II. Analyse der Stoffwechselreaktion.

1.

Die Ursache für die in unseren Versuchen nach Acetylcholinzusatz beobachtete *Stoffwechselsteigerung* dürfte wenigstens teilweise darin gegeben sein, daß der Erregungsvorgang mit einer Durchlässigkeitssteigerung der Zellgrenzschichten bzw. Membranen verbunden ist[1]. Da die beschränkte Permeabilität den begrenzenden Faktor bei Stoffwechselvorgängen darstellt, muß eine Permeabilitätssteigerung den Stoffaustausch begünstigen. Damit wird gleichzeitig verständlich, daß ein schädigender Eingriff dieselbe Stoffwechselreaktion auslösen kann wie ein physiologischer Reiz, denn in beiden Fällen kommt es zu einer Permeabilitätssteigerung[2, 1].

Neben der Stoffwechselsteigerung beobachteten wir sowohl nach physiologischer Erregung wie nach Schädigung eine *aerobe Bildung „fixer" Säuren*. Als Maß dieser diente die Größe des Überschusses des freigesetzten CO_2 über die Sauerstoffaufnahme [„Extrakohlensäure"

[1] *E. Gellhorn*, „Das Permeabilitätsproblem". Berlin 1929. — [2] *N. Brock, H. Druckrey* u. *H. Herken*, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. z. Z. im Druck 1938.

(*Warburg*)], da der respiratorische Quotient bei Zuckerverbrennung 1 beträgt.

Die nach Acetylcholinzusatz beobachtete Säurebildung kann nicht auf die bei seiner Verseifung erfolgende Freisetzung von Essigsäure bezogen werden, weil diese mengenmäßig um zwei Größenordnungen kleiner ist als die tatsächlich beobachtete Säurebildung. Danach muß die Säurebildung aus Stoffwechselvorgängen stammen. Der Gedanke an eine Kohlenhydratspaltung liegt am nächsten. Aus diesem Grunde haben wir die Wirkung des Acetylcholins an Speicheldrüsenschnitten in *zuckerfreier* Ringerlösung untersucht. Das Ergebnis ist völlig eindeutig. Hier trat wohl noch der charakteristische Stoffwechselanstieg, aber keine aerobe Säurebildung mehr auf (Abb. 5). Für diese wird also sicher Glucose verbraucht. Hier sind zwei Deutungen möglich. *Entweder* wird die Glucose der Suspensionsflüssigkeit beim „Erregungsvorgang" *unmittelbar* gespalten, *oder* sie dient während des Ruhestoffwechsels zunächst zum Aufbau von Glykogen, aus dessen Spaltung dann erst während der Erregung Säure frei wird. In diesem Falle läge also ein Sachverhalt vor, wie ihn *Willstätter* und *Rohdewald*[1] kürzlich für eine Hefesorte und Leukocyten beschrieben, für die man bisher stets eine echte Glykolyse annahm.

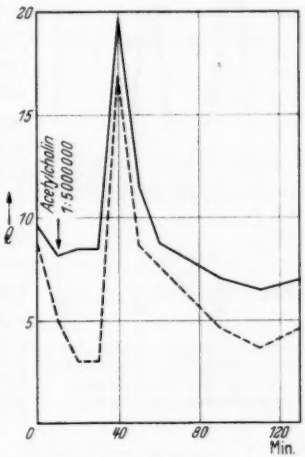


Abb. 5. Wirkung von Acetylcholin auf den Stoffwechsel von Speicheldrüsenschnitten in glucose*freier* Ringerlösung.

Die Frage ob es eine echte Glykolyse gibt oder ob die Säurebildung aus Glucose stets auf dem Umweg über Glykogensynthese und Glykogenolyse erfolgt, wie die genannten Autoren meinen, steht heute im Vordergrund des Interesses[2]. Da *Willstätter* mit Recht bemängelt, daß die zahlreichen Untersuchungen über „glykolytische" Prozesse diesen Unterschied nicht genügend berücksichtigen und da unsere Versuche eine gewisse Klärung für den Fall des Warmblütergewebes zu bringen scheinen, seien sie hier ausführlicher wiedergegeben.

2.

Zunächst sei die Beobachtung behandelt, daß Speicheldrüsenschnitte auch in zuckerfreier Ringerlösung auf Acetylcholin den typischen

[1] *R. Willstätter* u. *M. Rohdewald*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **247**, 115 u. 269, 1938. — [2] *T. Goda*, diese Zeitschr. **298**, 431, 1938.

Stoffwechselanstieg zeigen. Hierbei muß also zelleigenes Substrat verbrannt werden. Glykogen käme dafür kaum in Frage, einmal, weil die Speicheldrüse recht glykogenarm ist; zum anderen müßte bei Vorhandensein von Glykogen noch eine aerobe „Säurebildung" möglich sein; eine solche haben wir aber in zuckerfreier Lösung nie beobachtet. Es bliebe also nur die etwas gewaltsam erscheinende Annahme, daß geringe Glykogenreste noch vorhanden seien, die wohl noch als Substrat für die Atmung, nicht aber mehr für die Spaltung ausreichen. Näher läge es vielleicht, das Auftreten der Atmungssteigerung bei fehlender Bildung fixer Säuren darauf zu beziehen, daß wohl noch oxydables Substrat, aber nicht mehr ausreichend spaltbares „Kohlenhydrat" vorhanden ist.

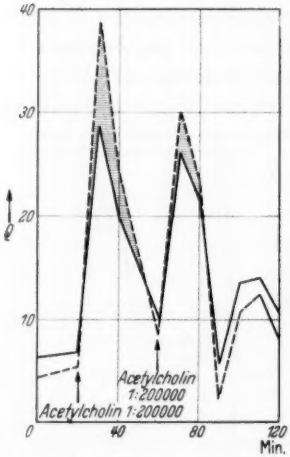


Abb. 6. Wirkung wiederholter Dosen Acetylcholin auf den Stoffwechsel der Speicheldrüse (glucosehaltige Ringerlösung).

Zunächst wäre zu versuchen, Hinweise dafür zu gewinnen, ob bei der Atmungssteigerung nach Acetylcholinzusatz in zuckerfreier Lösung „Kohlenhydrat" verbrannt wird oder andere oxydable Gewebsbestandteile. Wenn es sich um „Kohlenhydrate"[1] handelte, so könnten es nur noch sehr geringe Mengen sein, es müßte also möglich sein,

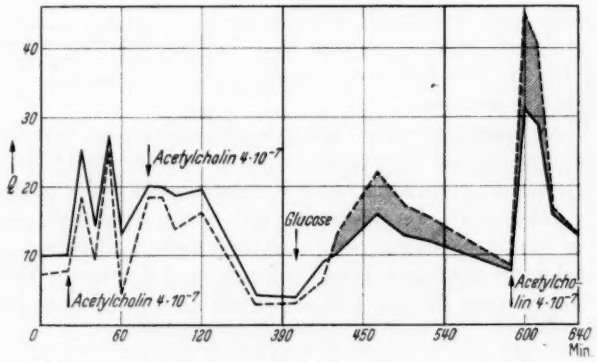


Abb. 7. Wirkung von Acetylcholin auf den Stoffwechsel von Gewebsschnitten der Speicheldrüse in glucosefreier und glucosehaltiger Ringerlösung (siehe Text).

[1] Unter der Bezeichnung „Kohlenhydrat" sind auch diejenigen Produkte des Kohlenhydratstoffwechsels verstanden, die zwar nicht mehr der Bruttoformel $C_xH_{2x}O_x$ entsprechen, jedoch im Stoffwechsel noch oxydabel sind.

diese geringen Reserven durch wiederholte Erregung zu erschöpfen. An sich ist die Drüse in der Lage, auch auf mehrfache sehr hohe Acetylcholindosen stets in der charakteristischen Weise zu reagieren, wie Untersuchungen in zucker*haltiger* Ringerlösung zeigen (Abb. 6). Im glucose*freien* Medium blieb indessen schon die zweite Acetylcholindosis ohne Wirkung (Abb. 7). Für die Atmungssteigerung beim Erregungsvorgang scheint also das Vorhandensein von oxydablem „Kohlenhydrat" notwendig zu sein. Diese Auffassung konnte weitgehend sichergestellt werden, denn nach Zuckerzusatz trat bei der Erregung durch Acetylcholin in allen Fällen nicht nur die Atmungssteigerung, sondern auch die aerobe Säurebildung (Abb. 7, 8 u. 9) wieder auf.

3.

Weitere wichtige Hinweise auf die Bedeutung des Kohlenhydrats für die Oxydationen ließen sich aus der Untersuchung des „Grundstoffwechsels" gewinnen. Dieser liegt auffälligerweise im zucker*freien* Medium zunächst um etwa 100% höher als im zuckerhaltigen. Wird nun Zucker zugesetzt, so *sinkt* der Stoffwechsel auf „normale" Werte (Abb. 8). Die Tatsache, daß der Stoffwechsel bei Substratmangel hoch ist und bei Substratzugabe sinkt, ist vom chemischen Standpunkt nicht zu verstehen. Wir nehmen deshalb an, daß physikalische Vorgänge eine Rolle spielen, und zwar vor allem Änderungen der Permeabilität. Dies um so mehr, als *Runnström*[1] an Hefe zeigen konnte, daß Zucker die Durchlässigkeit der Zellmembran herabsetzt, also abdichtend wirkt, während bei Zuckermangel erhöhte Permeabilitätswerte gefunden wurden. In gleiche Richtung deuten auch eine ganze Reihe älterer Versuche. So schützte Rohrzuckerzusatz rote Blutkörperchen

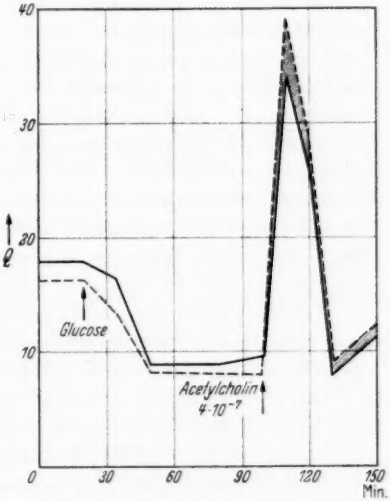


Abb. 8. Wirkung eines Zuckerzusatzes auf den erhöhten Stoffwechsel von Speicheldrüsenschnitten in glykosefreier Ringerlösung.

[1] *J. Runnström* u. *E. Sperber*, diese Zeitschr. **298**, 340, 1938.

vor der Auflösung durch verschiedene Alkaloide[1] oder hemmte das Eindringen von Vitalfarbstoffen[2]. Durch Herabsetzung der Permeabilität muß Glucose den Stoffaustausch hemmen können. Es ist aber auch das Gegenteil möglich, wie unten gezeigt werden wird.

Wenn Speicheldrüsengewebe in zuckerfreier Ringerlösung wohl noch einen hohen Stoffwechsel, aber auf einen Reiz keine Stoffwechselsteigerung mehr zeigt, so kann das darauf zu beziehen sein, daß das vorhandene Substrat zwar als Energiequelle für den „Grundstoffwechsel" geeignet ist, für den „Erregungsstoffwechsel" aber entweder qualitativ oder quantitativ nicht ausreicht. Das letztere scheint der Fall zu sein, denn nach wiederholter Reizung durch Acetylcholinzusatz oder längerem Aufenthalt des Gewebes in zuckerfreier Ringerlösung, also nach Erschöpfen der letzten Substratreserven, sinkt auch der Grundstoffwechsel katastrophal ab (Abb. 7). Daß das Absinken des Stoffwechsels hier tatsächlich auf eine Substratverarmung („Substratschuld") zu beziehen ist, ergibt sich daraus, daß nun nach Glucosezusatz der Stoffwechsel wieder erheblich ansteigt (Abb. 7).

Je nach den Umständen kann also ein Substratzusatz den Stoffwechsel beschleunigen oder hemmen. Solchen Sachverhalten wird bei biochemischen Untersuchungen oft nicht genügend Rechnung getragen. Die lebende Zelle ist zu kompliziert, als daß sie nur chemischen Gesetzen gehorchte. Die pharmakologische Erfahrung liefert zahlreiche Beispiele dafür, daß die Spezifität und das Ausmaß der Wirkung eines Stoffes keineswegs ausschließlich von seiner chemischen Natur und der angewendeten Dosis abhängt, sondern oft in entscheidender Weise von der Reaktionslage des Organismus bestimmt wird, auf den er wirkt. Für die Beurteilung einer Wirkung ist also die Kenntnis beider Teile eine notwendige Voraussetzung.

Die Folgen des Substratmangels oder Zusatzes lassen sich also nicht nach dem Massenwirkungsgesetz vorherbestimmen, denn der Substratmangel schädigt das Gewebe offenkundig. Damit ist eine Veränderung der Zellgrenzschichten im Sinne einer Permeabilitätssteigerung verbunden. Unter diesen Bedingungen wird der Stoffaustausch beschleunigt vonstatten gehen, wird der Stoffwechsel also erhöht sein, solange noch Substrat vorhanden ist. Fehlt dieses dagegen oder sind im Verlauf des „Erregungs-" oder „Schädigungsstoffwechsels" die Reserven erschöpft, so muß der Stoffwechsel unter Umständen bis zum Nullpunkt absinken. Diese Verhältnisse gehen aus der Abb. 7 gut hervor.

Glykosezusatz senkt an der Speicheldrüse den in zuckerfreier Ringerlösung erhöhten und steigert den unter gleichen Bedingungen ab-

[1] *H. Handovsky*, Pflügers Arch. **195**, 253, 1922; *H. Rhode*, diese Zeitschr. **131**, 560, 1922; *O. Laves*, ebenda **161**, 416, 1925; *K. Hiruma*, Pflügers Arch. **200**, 497, 1923; *K. Tanaka*, ebenda **203**, 447, 1924. — [2] *R. Höber* u. *A. Memmesheimer*, Pflügers Arch. **118**, 564, 1923, dort weitere Literatur.

gesunkenen Stoffwechsel in beiden Fällen bis auf einen Mittelwert, der der „normalen" Höhe entspricht. Gleichzeitig wird die normale Erregbarkeit der Drüse wiederhergestellt, so daß ein Zusatz von Acetylcholin nun nicht nur eine Stoffwechselsteigerung, sondern auch wieder eine aerobe Kohlenhydratspaltung auslöst.

4.

Die an der glykogenarmen Speicheldrüse beobachtete aerobe „*Säurebildung*" ist nach den vorliegenden Versuchen an das Vorhandensein ausreichender Mengen Glucose gebunden, also auf eine Kohlenhydratspaltung zu beziehen. Es bleibt die oben bereits aufgestellte

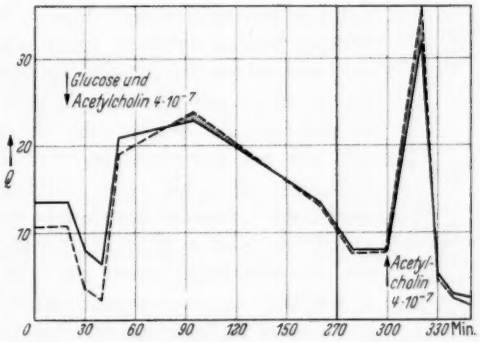


Abb. 9. Gleichzeitiger Zusatz von Glucose und Acetylcholin. Stoffwechselanstieg und „Extrakohlensäure"-Bildung treten erst nach längerer Latenz auf. (Erklärung im Text).

Frage zu klären, ob die Glucose selbst gespalten wird (Glykolyse), oder ob zunächst eine Glykogensynthese stattfindet, bei dessen Spaltung dann erst die sauren Valenzen frei werden (Glykogenolyse).

Ein wichtiger Hinweis kann sich aus der Untersuchung des zeitlichen Abstandes zwischen Zuckerzusatz und Säurebildung ergeben. Wir haben dies Kriterium in unserer Versuchsanordnung angewendet, indem wir die Glucose einem substrat-verarmten Versuchsansatz nicht vorher, sondern erst gleichzeitig mit der Acetylcholineinwirkung zusetzten. Wenn Glucose unmittelbar als Substrat dienen könnte, müßte jetzt das Gewebe sofort auf das Acetylcholin ansprechen und auch sofort „fixe" Säuren bilden. Das war aber nicht der Fall. Die „Erregung" trat vielmehr erst mit einer Latenz von etwa 20 Minuten und zwar meist sogar nach einem flüchtigen Abfall des Stoffwechsels (Permeabilitätsänderung?) ein, die Säurebildung im vorliegenden Beispiel sogar erst nach 60 Minuten (Abb. 9).

Die in beiden Fällen beobachtete Latenz kann zwei Gründe haben. Einmal könnte sie auf eine vorausgehende Glykogensynthese hindeuten

zum anderen dadurch bedingt sein, daß durch den Zuckerzusatz zunächst die strukturelle Integrität des Gewebes (z. B. normale Permeabilität) als Voraussetzung für die Reaktionsfähigkeit wiederhergestellt wird. Auf jeden Fall aber spricht die Verzögerung gegen eine unmittelbare Spaltung der Glucose. Das ließ sich bei einer anderen Versuchsanordnung noch klarer zeigen. Wenn Speicheldrüsengewebe bis zur Erschöpfung aller Substratreserven („Substratschuld" s. oben) in zuckerfreier Ringerlösung untersucht wurde, tritt auf Glucosezusatz (ohne Acetylcholin!) nicht nur eine Stoffwechselsteigerung, sondern auch eine anhaltende aerobe Extrakohlensäurebildung ein (Abb. 7), die wir mit der Schädigung des Gewebes in Zusammenhang bringen. Diese Säurebildung beginnt ebenfalls nicht sofort, wie es bei einer echten Zuckerspaltung stets zu beobachten ist (s. unten), sondern erst nach etwa 20 Minuten, also mit etwa der gleichen Latenzzeit wie bei solchen Hefen, bei denen nach *Willstätter* zunächst eine Glykogensynthese stattfindet. Enthält das Gewebe dagegen Glykogen, so setzt z. B. nach Acetylcholinzusatz die „Säurebildung" sofort ein (Abb. 1, 2, 4, 6, 7, 8 u. 9).

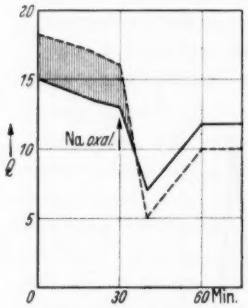


Abb. 10. Leicht geschädigte Leberschnitte. Auch in zuckerfreier Ringerlösung besteht aerobe Säurebildung, die durch Oxalatzusatz (Endkonzentration stets n/250) aufgehoben wird.

Unsere Befunde sprechen also dafür, daß die aerobe Extrakohlensäurebildung bei der physiologischen Erregung der Speicheldrüse auf eine *Glykogenolyse* zu beziehen ist. Die Glucose der Suspensionsflüssigkeit wird nicht unmittelbar gespalten. Die Speicheldrüse wäre demnach in der Lage, zugesetzte Glucose zur Glykogensynthese zu benutzen.

Die nach *schädigenden* Eingriffen auftretende flüchtige aerobe „Extrakohlensäure"-Bildung ist ähnlich zu beurteilen, wie schon aus der Kurve 7 hervorgeht, sofern die Schädigung geringgradig und noch leicht reversibel ist (s. unten). Hierbei handelt es sich nicht um eine Besonderheit des Speicheldrüsengewebes. Auch andere, besonders glykogenhaltige Gewebe, z. B. Leberschnitte, zeigen nach leichter Schädigung vorübergehend aerobe Spaltprozesse, die nicht als Glykolyse, sondern wohl als Glykogenolyse aufzufassen sind. Das ergibt sich einmal aus dem Erhaltenbleiben der Säurebildung bei Untersuchung in zuckerfreier Ringerlösung und zum anderen aus der Empfindlichkeit gegen Oxalat (Abb. 10)[1], das nach *Lohmann*[2] die Kohlenhydrat-Spaltung vergiftet, soweit sie über phosphorylierte Zwischenstufen verläuft.

[1] *H. Herken*, Arch. f. exper. Zellf. z. Z. im Druck 1938. — [2] Literatur bei *K. Lohmann*, diese Zeitschr. **222**, 324, 1930.

Bei Untersuchungen an Geweben, die durch schwere Eingriffe *hochgradig* geschädigt waren, fanden wir ebenfalls eine aerobe Extrakohlensäurebildung, die sich jedoch von der bei *leicht* geschädigten Geweben beobachteten schon durch ihr Ausmaß und vor allem dadurch unterschied, daß sie nur schwer oder gar nicht mehr reversibel war. Wir haben uns nun mit der Frage beschäftigt, ob die Säurebildung hier ebenfalls auf eine Glykogenolyse zu beziehen ist, ob also zwischen der Wirkung leichter und *schwer* schädigender Eingriffe auf den Stoffwechsel nur quantitative Unterschiede bestehen, oder ob hier andere Verhältnisse vorliegen.

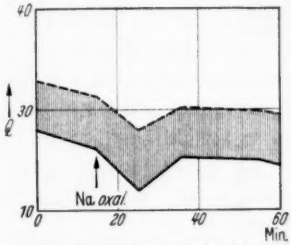


Abb. 11. Schwer geschädigte Schnitte der Speicheldrüse (Hypertonie). „Extrakohlensäure"-Bildung, die „oxalatfrei" ist. (Ringerlösung glucosehaltig.)

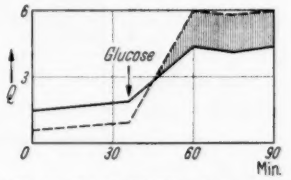


Abb. 12. Gewebsschnitte einer „geschädigten" Speicheldrüse (3 Tage auf Eis gelegen) in glucosefreier Ringerlösung. Auf Glucosezusatz sofort Säurebildung (vgl. Abb. 7).

Speicheldrüsengewebe wurde z. B. durch mehrtägige Aufbewahrung auf Eis und bei Sauerstoffmangel oder durch Behandeln mit hypertonischer Lösung schwer geschädigt. Nach diesen Eingriffen trat eine kräftige und anhaltende Extrakohlensäurebildung auf, die für sich allein so hoch war, wie die CO_2-Bildung von normalen Speicheldrüsenschnitten. Oxalat beeinflußte diese Säurebildung nicht (Abb. 11). In zuckerfreier Ringerlösung fehlte sie, der Stoffwechsel lag am Nullpunkt. Wurde jetzt Zucker zugesetzt, so setzte die Säurebildung nicht nach einiger Latenz, sondern *sofort* ein (Abb. 12). Die aerobe Extrakohlensäurebildung verhält sich am schwer geschädigten Gewebe also völlig anders, wie am „gereizten" oder leicht geschädigten Organ; sie entspricht nicht mehr einer Glykogenolyse, sondern einer echten Glykolyse. Diese Verhältnisse treffen nicht nur für Speicheldrüsengewebe zu. Auch an Schnitten z. B. der Rattenleber, die nach geringgradiger Schädigung eine durch Oxalat leicht zu beseitigende Glykogenolyse zeigen (Abb. 10), konnte nach entsprechend schwerer Schädigung eine Glykolyse beobachtet werden, die durch Oxalat nicht mehr vergiftet werden konnte (Abb. 13). Die „Glykolyse" schwer geschädigter Gewebe verhält sich gegenüber den angewendeten Kriterien also so, wie die Glykolyse bösartiger Tumoren. Diese spaltet ebenfalls die Glucose der Ringerlösung, die Spaltung setzt bei Zuckerzusatz ebenfalls ohne Latenz ein und wird durch Oxalat nicht vergiftet.

Unsere Befunde sind nur insoweit als beweisend anzusehen, als sie zeigen, daß die Bildung fixer Säuren durch Kohlenhydratspaltung an der gleichen Gewebsart einerseits nach physiologischem Reiz oder *leichter* Schädigung und andererseits nach *schwer* schädigenden Eingriffen auf qualitativ verschiedene Vorgänge zu beziehen ist; sie machen wahrscheinlich, daß es sich im einen Falle um einen glykogenolytischen, im anderen Falle um einen glykolytischen Prozeß handelt. Für einen

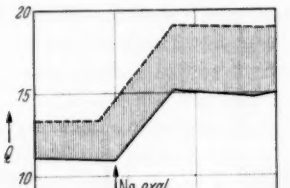


Abb. 13. Schwer geschädigte Leberschnitte (Hungerleber). Oxalatfeste Säurebildung in glykosehaltiger Ringerlösung (vgl. Abb. 10).

endgültigen Beweis in dieser Richtung sind weitere Untersuchungen erforderlich, die jedoch außerhalb unseres Aufgabengebietes liegen. Das Speicheldrüsengewebe scheint uns für solche Untersuchungen besonders geeignet zu sein.

Zusammenfassung.

1. Der Gewebsstoffwechsel der Speicheldrüse von Hund, Katze und Ratte wird nach der Methode von *Warburg* untersucht.

2. Auf Zusatz von Acetylcholin („physiologischer Reiz") zeigen Speicheldrüsenschnitte einen charakteristischen Stoffwechselanstieg mit Auftreten einer aeroben „Extrakohlensäure"-Bildung. Durch Atropin läßt sich die Wirkung aufheben. Die Drüse reagiert also in vitro grundsätzlich ebenso wie in vivo.

3. Die Acetylcholinwirkung wird als Kriterium für die normale Reaktionsfähigkeit der Speicheldrüsenschnitte benutzt. Sauerstoffmangel hebt die Erregbarkeit auf. Bei tiefer Temperatur ($+ 4^0$) überlebt das Gewebe dagegen auch langdauernden Sauerstoffmangel. Durch Zerquetschen (Brei) wird die Reaktionsfähigkeit des Speicheldrüsengewebes nicht notwendig aufgehoben.

4. Die Reaktionsfähigkeit der Speicheldrüsenschnitte auf Acetylcholin setzt das Vorhandensein von Kohlenhydrat voraus. Und zwar wird als Energiequelle sowohl für den „Grundstoffwechsel" als auch für

den erhöhten Stoffwechsel nach physiologischem und unphysiologischem „Reiz" stets zelleigenes Kohlenhydrat benutzt, das jedoch aus der glucosehaltigen Ringerlösung ergänzt wird. Die nach „physiologischer Erregung" oder geringgradiger „Schädigung" beobachtete Bildung „fixer" Säuren unter Verbrauch von Glucose erfolgt wahrscheinlich auf dem Umweg über Glykogensynthese und Glykogenolyse. Sie ist leicht reversibel.

5. Nach Erschöpfen der Kohlenhydratreserven erlischt zuerst die Erregbarkeit, anschließend sinkt auch der „Grundstoffwechsel" bis an den Nullpunkt. Zusatz von Glucose stellt nun nicht nur den „Grundstoffwechsel", sondern auch die normale Erregbarkeit wieder her.

6. Das Kohlenhydrat scheint nicht nur als „Substrat" zu dienen, sondern auch für die Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der normalen Permeabilitätsverhältnisse wichtig zu sein.

7. Nach *schwer* schädigenden Eingriffen tritt ebenfalls eine „Extrakohlensäure"-Bildung auf. Diese verhält sich wie eine Glykolyse. Sie ist nur schwer oder gar nicht reversibel.

Über die Wirkung einiger Enolester des Testosterons.

Von

K. Miescher, W. H. Fischer und **E. Tschopp.**

(Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der Ciba, Pharmazeutische Abteilung.)

(Eingegangen am 11. November 1938.)

Mit 9 Abbildungen im Text.

Vor Jahresfrist wurden hier Versuche unseres Laboratoriums über die Wirkungsverstärkung männlicher Sexualhormone durch Veresterung mitgeteilt[1]. Bereits 1936 hatten *L. Ruzicka* und *W. H. Fischer* durch Enolisierung von 3-Ketosteroiden erhältliche 3-Enolester, insbesondere auch des Testosterons (Diacetat und Dipropionat), beschrieben[2]. Wie dort kurz erwähnt ist, erwies sich das Testosterondiacetat am Kapaunenkamm als etwas weniger wirksam, im Test mit einmaliger Injektion an der Ratte aber als deutlich wirksamer als Testosteron-17-monoacetat. Schon damals wurde darauf hingewiesen, daß sich unter den Diestern des Testosterons vielleicht Präparate befinden könnten, die zu den stärkst wirksamen männlichen Sexualhormonen zu zählen sind.

In einer vorläufigen Mitteilung vom letzten Herbst berichteten wir kurz über vergleichende Versuche mit folgenden vier Enolestern des Testosterons[3]: Diacetat, 3-Acetat-17-propionat, Dipropionat und 3-Acetat-17-n-butyrat. Es zeigte sich, daß diese Verbindungen nach ihrem Schwellenwert am Kapaunenkamm, sowie im 10-Tage-Test an der Ratte nicht besonders hervortreten, ja gegenüber den entsprechenden 17-Monoestern unterlegen sind. Dagegen kehrt sich dieses Verhältnis bei Prüfung nach dem von uns eingeführten Test mit einmaliger Injektion entschieden zugunsten der Enolester um.

Inzwischen sind diese Versuche fortgeführt und auf weitere 6 Enolester des Testosterons ausgedehnt worden. Dabei konnten teilweise auch jene Auswertungsmethoden Berücksichtigung finden, die wir bei ähnlichen Untersuchungen in der Reihe der Ester des Oestrons und Oestradiols kürzlich mit Erfolg entwickeln konnten[4].

---

[1] *K. Miescher, H. Kägi, C. Scholz, A. Wettstein* u. *E. Tschopp*, diese Zeitschr. **294**, 39, 1937. — [2] *L. Ruzicka* u. *W. H. Fischer*, Helv. Chim. Acta **19**, 806, 1371, 1936. — [3] *K. Miescher, W. H. Fischer* u. *E. Tschopp*, Nature **140**, 726, 1937. — [4] *K. Miescher*, Schweiz. med. Wochenschr. **67**, 1046, 1937; **68**, 1345, 1938; *K. Miescher, C. Scholz* u. *E. Tschopp*, Biochem. J. **32**, 141, 725 u. 1273, 1938.

I. Herstellung der Enolester.

Bisher ist nur über die Darstellung *symmetrischer* Diester des Testosterons berichtet worden, welche an der Enolgruppe in 3- und an der normalen Hydroxylgruppe in 17-Stellung denselben Säurerest aufweisen. Nachfolgend beschreiben wir nun auch eine Reihe *gemischter* Diester. Dabei gingen wir stets von entsprechenden Testosteron-17-monoestern aus. Ist der in 3-Stellung einzuführende Säurerest niedriger als der in 17-Stellung befindliche, so kann man ohne weiteres nach der früher von *Ruzicka* und *Fischer* angegebenen Methode vorgehen. So erhält man z. B. die 3-Enolacetate des Testosteron-17-propionates, -n-butyrates und -isobutyrates durch 40stündiges Kochen des betreffenden Testosteron-17-esters mit Essigsäureanhydrid unter Zusatz von wasserfreiem Natriumacetat und das 3-Enolpropionat des Testosteron-17-isobutyrates durch 6stündiges Kochen des 17-Isobutyrates mit Propionsäureanhydrid und wasserfreiem Natriumpropionat.

Ist der in 3-Stellung einzuführende Säurerest höher als der in 17-Stellung befindliche, so erschien eine Umesterung möglich. Trotzdem führte die Umsetzung von Testosteronacetat mit Propionsäureanhydrid in Gegenwart von Natriumpropionat noch in durchaus normaler Weise zum Testosteron-3-propionat-17-acetat. In anderen Fällen waren aber zweckmäßig die Reaktionsbedingungen durch Zusatz eines Verdünnungsmittels zu mildern. So wurde bei der Veresterung von Testosteron-17-acetat und -propionat mit n-Buttersäureanhydrid jeweils etwas Benzin (Kp. 110^0) zugesetzt, dafür aber etwas länger gekocht (15 Stunden). Auch die enolisierende Veresterung des Testosteronacetats mit Benzoylchlorid in Benzin gelang bei 40stündigem Kochen ohne Umesterung, wenn man nach Abdestillieren des Benzins im Vakuum das überschüssige Benzoylchlorid mit viel Äthylalkohol zur Umsetzung brachte und den gebildeten Enolester unter vorsichtigem Zusatz von Wasser auskristallisieren ließ.

Von Interesse schien nun auch die Darstellung von Testosteron-3-enolestern mit freier Hydroxylgruppe in 17-Stellung durch partielle Verseifung entsprechender Diester. Allein diese Versuche scheiterten selbst dann, wenn unter mildesten Bedingungen gearbeitet wurde. So ließen wir auf das 3, 17-Diacetat, das 3-Propionat-17-acetat oder das 3-Benzoat-17-acetat des Testosterons 1 und selbst nur $^1/_2$ Äquivalent Pottasche in wässerig-methanolischer Lösung bei gewöhnlicher Temperatur einwirken. Stets wurde die Enolestergruppe zuerst verseift und es entstanden je nach den Arbeitsbedingungen entweder Testosteron oder Testosteron-17-acetat oder ein Gemisch dieser Verbindungen.

Nachfolgend wird die Herstellung der einzelnen von uns neu gewonnenen Enolester beschrieben:

Testosteron-3-acetat-17-propionat.

500 mg Testosteronpropionat und 800 mg frisch geschmolzenes Natriumacetat wurden in 15 ccm Essigsäureanhydrid während 40 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach vollständigem Abdampfen des Acetanhydrids im Vakuum löste man das Natriumacetat in wenig Wasser und versetzte das Gemisch in der Wärme mit soviel Äthanol, daß Lösung eintrat. Beim Abkühlen kristallisierten 490 mg des Enolacetats des Testosteronpropionats in Nadeln, die nach Umlösen aus Methanol bei 140 bis 141° schmolzen und mit Tetranitromethan Braunfärbung gaben.

3,697 mg Substanz gaben 10,125 mg CO_2 und 2,975 mg H_2O.
$C_{24}H_{34}O_4$. Ber.: C 74,56%, H 8,87%.
Gef.: C 74,69%, H 9,01%.

Testosteron-3-acetat-17-n-butyrat.

200 mg Testosteron-n-butyrat wurden in oben beschriebener Weise umgesetzt. Man erhielt nach Aufarbeitung 175 mg aus wässerigem Methanol in Nadeln ausfallendes Enolacetat des Testosteronpropionats, das aus Methanol umgelöst einen F. von 96,5 bis 98° zeigte.

4,997 mg Substanz gaben 13,740 mg CO_2 und 4,06 mg H_2O.
$C_{25}H_{36}O_4$. Ber.: C 74,95%, H 9,06%.
Gef.: C 74,99%, H 9,09%.

Testosteron-3-acetat-17-isobutyrat.

Auf gleiche Art wurden aus 300 mg Testosteronisobutyrat 295 mg rohes Enolacetat erhalten, das nach dreimaligem Umlösen aus Methanol konstant bei 134 bis 136° schmolz. Mit Testosteronisobutyrat gemischt gab es starke Schmelzpunktsdepression und mit Tetranitromethan Braunfärbung.

3,828 mg Substanz gaben 10,49 mg CO_2 und 3,14 mg H_2O.
$C_{25}H_{36}O_4$. Ber.: C 74,95%, H 9,06%.
Gef.: C 74,74%, H 9,18%.

Testosteron-3-propionat-17-acetat.

500 mg Testosteronacetat wurden mit 500 mg Natriumpropionat und 20 ccm Propionsäureanhydrid während $6^1/_2$ Stunden gekocht.

Auch hier verdampfte man das Anhydrid im Vakuum, nahm in wenig Wasser auf und versetzte heiß mit Äthanol bis Lösung eintrat. Beim Abkühlen fielen 420 mg in Nadeln aus, die aus Methanol umgelöst wurden und hierauf konstant bei 139,5 bis 141° schmolzen. Das Reaktionsprodukt gab sowohl mit seinem Isomeren, dem Testosteron-3-acetat-17-propionat, als auch mit Testosteronacetat deutliche Schmelzpunktsdepression.

4,098 mg Substanz gaben 11,19 mg CO_2 und 3,32 mg H_2O.
$C_{24}H_{34}O_4$. Ber.: C 74,56%, H 8,87%.
Gef.: C 74,47%, H 9,07%.

Testosteron-3-propionat-17-isobutyrat.

250 mg Testosteronisobutyrat und 250 mg frisch geschmolzenes Natriumpropionat wurden in 10 ccm Propionsäureanhydrid während

6½ Stunden gekocht. Nach der dem vorangehenden Beispiel ganz analogen Aufarbeitung isolierten wir 205 mg Enolpropionat des Testosteronisobutyrats, dessen Schmelzpunkt nach Umlösen aus Methanol bei 133,5 bis 135° lag und das mit dem oben beschriebenen, fast gleichschmelzenden Testosteron-3-acetat-17-isobutyrat eine starke Depression ergab.

4,328 mg Substanz gaben 11,92 mg CO_2 und 3,54 mg H_2O.
$C_{26}H_{38}O_4$. Ber.: C 75,31%, H 9,25%.
Gef.: C 75,11%, H 9,16%.

Testosteron-3-n-butyrat-17-acetat.

500 mg Testosteronacetat und 500 mg frisch geschmolzenes Natrium-n-butyrat wurden in 9 ccm n-Buttersäureanhydrid und 1 ccm Benzin (Kp. 110°) während 15 Stunden bei einer Ölbadtemperatur von 190 bis 200° erhitzt. Nach Abdampfen im Vakuum und Aufnahme des Rückstandes in heißem, wässerigem Äthanol erhielt man 395 mg des Enol-n-Butyrats des Testosteronacetats beim Abkühlen in feinen Nadeln. Es wurde aus Methanol mehrmals umgelöst und wies nach dem vierten Male einen Schmelzpunkt von 97 bis 99° auf. Gemischt mit seinem Isomeren Testosteron-3-acetat-17-n-butyrat gab es starke Depression und mit Tetranitromethan die übliche Färbung.

4,486 mg Substanz gaben 12,36 mg CO_2 und 3,70 mg H_2O.
$C_{25}H_{36}O_4$. Ber.: C 74,95%, H 9,06%.
Gef.: C 75,14%, H 9,23%.

Testosteron-3-n-butyrat-17-propionat.

In ganz analoger Weise gewannen wir ausgehend von Testosteronpropionat dessen 3-n-Butyrat, das nach Umlösen aus Methanol bei 79 bis 80° schmolz.

4,703 mg Substanz gaben 13,01 mg CO_2 und 3,93 mg H_2O.
$C_{26}H_{38}O_4$. Ber.: C 75,31%, H 9,25%.
Gef.: C 75,44%, H 9,35%.

Testosteron-3-benzoat-17-acetat.

500 mg Testosteronacetat wurden in 25 ccm reinem Benzin (Kp. 110°) mit 5 ccm Benzoylchlorid während 41 Stunden gekocht. Nach Abdestillieren des Benzins im Vakuum nahm man das ölige Gemisch in Äthanol auf und versetzte es in der Wärme vorsichtig mit etwas Wasser. Beim Abkühlen wurde das Reaktionsprodukt sofort kristallin erhalten. Es war in Methanol bedeutend schwerer löslich als die oben beschriebenen Enolester und wurde daraus in sternförmig angeordneten Nadeln gewonnen. Es schmolz bei 192 bis 193° und gab mit Tetranitromethan ebenfalls Braunfärbung.

4,565 mg Substanz gaben 12,94 mg CO_2 und 3,15 mg H_2O.
$C_{28}H_{34}O_4$. Ber.: C 77,37%, H 7,89%.
Gef.: C 77,30%, H 7,73%.

II. Pharmakologische Untersuchung.

A. Prüfung am Kapaunenkamm.

Im Anschluß an unsere früheren Versuche wurde wiederum der Schwellenwert der Enolverbindungen am Kapaunenkamm bzw. die

Größe der internationalen Einheit bestimmt. Nach unserer mehrmals beschriebenen Methode[1] verursacht die subcutane Injektion von 100 γ Androsteron einen Zuwachs der Kapaunenkammoberfläche von 30%. Je nach dem verwendeten Präparat wird dieser Zuwachs früher oder später erreicht. Unsere Resultate mit den Enolestern sind in Tabelle I im Vergleich zu teilweise schon früher mitgeteilten Werten entsprechender Monoester und symmetrischer Diester sowie von freiem Testosteron

Tabelle I. Kapaunenkamm-Test.

Präparat	F.* °C	Internationale Einheit γ	Maximaler Zuwachs von 30% wird erreicht am
Testosteron (T)	154—156	15	7. Tag
T- 17-acetat	140—142	20	7. „
T-3-acetat- 17- „	150—151	35	10. „
T-3-propionat-17- „	139,5—141	40	10.—11. „
T-3-n-butyrat-17- „	97—99	60	12.—14. „
T-3-benzoat- 17- „	192—193	150	15.—17. „
T- 17-propionat	121—123	20	9. „
T-3-acetat- 17- „	140—141	40	12. „
T-3-propionat-17- „	125—127	45	14. „
T-3-n-butyrat-17- „	79—80	80	13.—15. „
T- 17-n-butyrat	111—113	60	12. „
T-3-acetat- 17- „	96,5—98	160	15. „
T- 17-isobutyrat ...	134—136	70	13. „
T-3-acetat- 17- „ ...	134—136	180	13.—15. „
T-3-propionat-17- „ ...	133,5—135	180	14.—15. „

* Mit Kurzthermometer bestimmt.

zusammengestellt. Man sieht daraus, daß in diesem Test das freie Testosteron sowie sein Acetat und Propionat die niedrigsten Einheiten aufweisen und das Maximum am raschesten erreichen. Ausgehend von den 17-Monoestern steigt der Wert für die Einheit jeweils von dem 3-Enolacetat zu den höheren 3-Enolestern regelmäßig an. Entsprechend wird auch das Wirkungsmaximum später erreicht. In manchen Fällen ist dies erst nach 2 Wochen der Fall. Es herrscht somit bei den Enolestern dieselbe Gesetzmäßigkeit wie sie früher in der Reihe der Testosteronmonoester von unserem Laboratorium nachgewiesen wurde.

Die Bestimmung der Schwellenwerte allein ergibt ein unvollständiges Bild der Wirkung der neuen Enolester. Es ist zu erwarten, daß bei Verwendung höherer Dosen sich der allgemeine Wirkungsverlauf wesentlich ändern würde. Entsprechende Versuche am Kapaunenkamm werden noch nachzuholen sein.

[1] *K. Miescher, A. Wettstein* u. *E. Tschopp*, Biochem. J. **30**, 1978, 1936.

B. Prüfung am Sexualtraktus der kastrierten männlichen Ratte.

1. 10-Tage-Test.

Um den Zusammenhang mit früheren Versuchen zu wahren, wurde die Wirkung der neuen Enolester im 10-Tage-Test an der kastrierten männlichen Ratte in gewohnter Weise bestimmt. Die Tiere erhielten die angegebenen Dosen, jeweils in 0,5 ccm Sesamöl gelöst, während 10 Tagen täglich subcutan injiziert. Am 11. Tage wurden sie getötet und die Sexualorgane gewogen. Des beschränkten Raumes wegen sind in den Abb. 1 bis 3 nur an Samenblasen und Prostatae gewonnene Resultate verwertet. Das durchschnittliche Ausgangsgewicht der Samenblasen bzw. der Prostatae betrug 1,4 bzw. 4,0 cg.

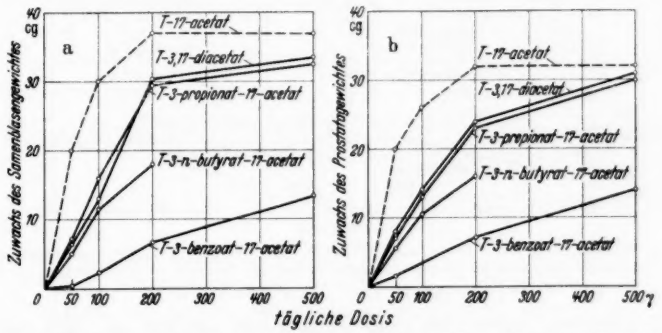


Abb. 1. Wirkung des T-17-acetats und seiner 3-Enolester auf Samenblasen und Prostata der kastrierten Ratte im 10-Tage-Test. Ausgangsgewicht der Samenblasen 1,4 cg, der Prostata 4 cg. (T = Testosteron.)

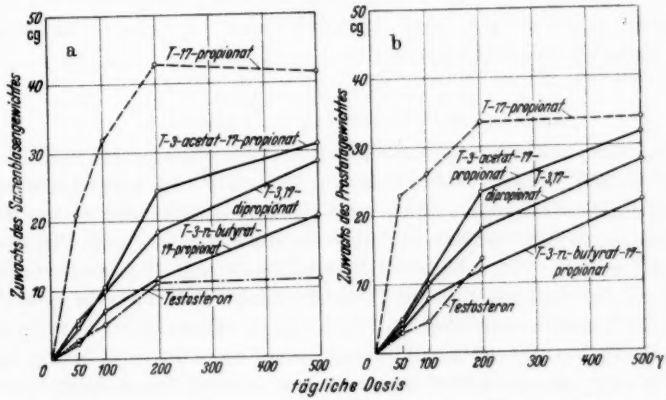


Abb. 2. Wirkung des T-17-propionats (Perandren) und seiner 3-Enolester sowie des freien Testosterons auf Samenblasen und Prostata der kastrierten Ratte im 10-Tage-Test. (T = Testosteron.)

Nach dem 10-Tage-Test sind alle Enolester den entsprechenden 17-Monoestern zum Teil ganz wesentlich unterlegen. Auf alle Fälle geht daraus hervor, daß die einzelnen 17-Monoester des Testosterons ein rascheres Wachstum der Sexualorgane hervorrufen als die Enolester. Wie wir aber schon mehrfach betonten, gibt dieser Test ein ungenügendes Bild der Wirkung der untersuchten Verbindungen, da ja ihr Maximum

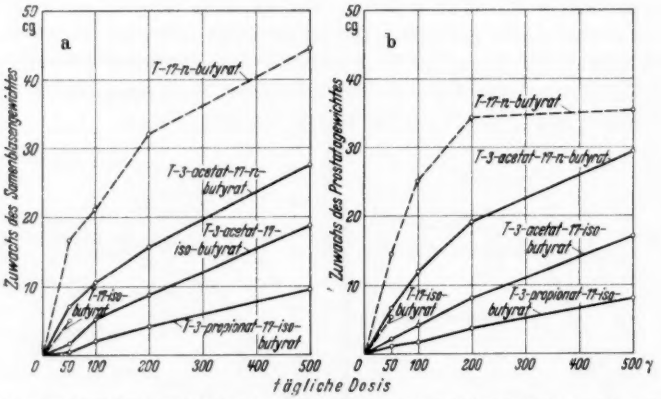


Abb. 3. Wirkung des T-17-n-butyrats und T-17-iso-butyrats und ihrer 3-Enolester auf Samenblasen und Prostata der kastrierten Ratte im 10-Tage-Test. (T = Testosteron.)

am 11. Tage im allgemeinen noch lange nicht erreicht ist. Wir sind daher neuerdings auch hier in einer Anzahl Fälle dazu übergegangen, den Gesamtverlauf der Wirkung zeitlich zu verfolgen. Dabei erhielten wir sehr interessante Ergebnisse, die unsere Vermutung durchaus bestätigten. Hierüber wird nach Abschluß dieser Versuche an anderem Orte ausführlicher berichtet werden.

2. Test mit einmaliger Injektion.

Bei dem von unserem Laboratorium erstmalig eingeführten Test mit einmaliger Injektion[1] wird z. B. eine Dosis von 2 mg einem größeren Tiermaterial verabfolgt. Nach bestimmten Zeitintervallen werden jeweils einige Tiere getötet und ihre Sexualorgane gewogen. In den Abb. 4 bis 9 sind die erhaltenen Samenblasen- und Prostatagewichte kurvenmäßig dargestellt. Die Versuchspunkte entsprechen jeweils den Mittelwerten aus mindestens 3 Versuchen. Während wir uns früher meist damit begnügten, den Wirkungsverlauf zwar über das Maximum der Wirkung hinaus zu verfolgen, ohne aber das völlige Abklingen der

[1] *K. Miescher, A. Wettstein* u. *E. Tschopp*, Biochem. J. **30**, 1982, 1936.

Wirkung festzulegen, bestimmten wir neuerdings nach Möglichkeit den vollständigen Wirkungsablauf sämtlicher untersuchter Verbindungen.

Um einen bequemen Überblick über das vorliegende Kurvenmaterial zu gewinnen, ist in Tabelle II jeweils der maximale Gewichtszuwachs, sowie die Anzahl Tage angegeben, nach der er erreicht wird. Ferner ist auch die Gesamtwirkungsdauer in Tagen verzeichnet.

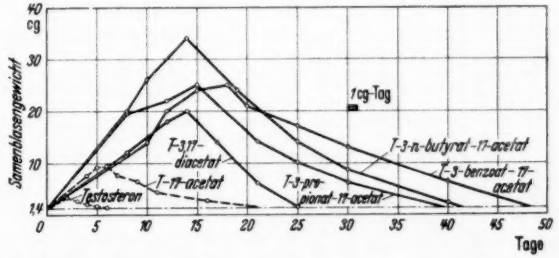


Abb. 4. Wirkung des T-17-acetats und seiner 3-Enolester sowie des freien Testosterons auf die Samenblasen der kastrierten Ratte im Test mit einmaliger Injektion von 2 mg. Ausgangsgewicht der Samenblasen 1,4 cg. (T = Testosteron.)

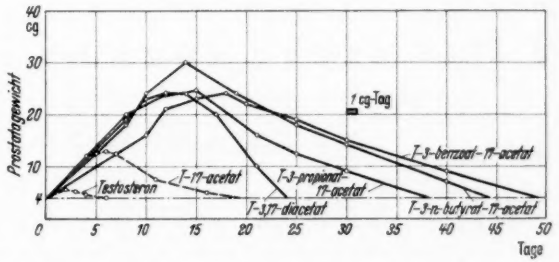


Abb. 5. Wirkung des T-17-acetats und seiner 3-Enolester sowie des freien Testosterons auf die Prostata der kastrierten Ratte im Test mit einmaliger Injektion von 2 mg. Ausgangsgewicht der Prostata 4 cg. (T = Testosteron.)

Wirkungszuwachs und Wirkungsdauer lassen sich, wie wir in unserer vorläufigen Mitteilung schon vor Jahresfrist zeigten[1], gleichzeitig erfassen, wenn man die von den Wirkungskurven und der Horizontalen durch den Kurvenanfangspunkt umschlossenen „Wirkungsflächen" ausmißt und untereinander vergleicht. Bildet man den Quotienten aus den Werten der Wirkungsflächen von Ester und freiem Hormon, so ergibt sich der durch die Veresterung erzielte *Nutzeffekt*[2].

[1] Siehe auch *K. Miescher*, Schweiz. med. Wochenschr. **67**, 1046, 1937. — [2] Die in unserer vorläufigen Mitteilung für den Nutzeffekt angegebenen Zahlenwerte sind irrtümlicherweise zu gering ausgefallen; sie werden durch die Angaben in Tabelle II richtiggestellt.

Tabelle II.

Test mit einmaliger Injektion von 2 mg (kastrierte männliche Ratte).

Präparat	Maximaler Gewichtszuwachs				Gesamtwirkungsdauer (Tage)		Wirkungsausbeute (cg-Tage)		Nutzeffekt			
	beträgt cg		wird erreicht nach Tagen						Testosteron = 1		T-17-monoester = 1	
	Samenblasen	Prostata	Samenblasen	Prostata	Samenblasen	Prostata	Samenblasen	Prostata	Samenblasen	Prostata	Samenblasen	Prostata
Testosteron (T)	2,1	1,8	2	2	6	6	5,8	5,0	1	1	—	—
T- 17-acetat ...	7,9	9	6	6	21	19	62	78	11	16	1	1
T-3-acetat- 17- „ ...	18,6	20	14	14	25	24	220	277	38	55	3,6	3,6
T-3-propionat- 17- „ ...	23,6	20,5	15	15	39	38	422	388	73	78	6,8	5,0
T-3-n-butyrat- 17- „ ...	32,6	26	14	14	41	44	561	523	97	105	9,0	6,7
T-3-benzoat- 17- „ ...	23,6	20	18	18	48	49	525	490	90	98	8,5	6,3
T- 17-propionat	25,1	21	11	11	25	25	253	236	44	47	1	1
T-3-acetat- 17- „	38,6	34	17	17	35	38	580	548	100	110	2,3	2,3
T-3-propionat- 17- „	36,6	32	17	20	37	40	625	610	108	122	2,5	2,6
T-3-n-butyrat- 17- „	31,1	26	22	22	55	54	633	592	109	118	2,5	2,5
T- 17-n-butyrat	34,6	31	13	13	28	28	385	344	66	69	1	1
T-3-acetat- 17- „	43,6	34	22	22	66	70	1000	1020	172	204	2,6	2,9
T- 17-isobutyrat	35,1	25	13	13	35	35	529	412	91	82	1	1
T-3-acetat- 17- „	18,6	18	16	16	38	46	297	348	51	70	0,6	0,8
T-17-propionat-17- „	24,1	20,5	18	16	50	50	500	488	86	98	0,9	1,2

Die durch die Messung der Wirkungsfläche gewonnene Zahl ist zur Wertung einer Verbindung insofern unbefriedigend, als sie sich vom gewählten Maßstab abhängig erweist. Durch Einführung des Begriffes der *Wirkungsausbeute* wurde neuerdings ein unabhängiges Maß gewonnen[1]. Die Einheit dieser Größe entspricht im vorliegenden Fall einem Gewichtszuwachs von 1 cg pro 1 Tag. Bei graphischer Darstellung wird die Einheit je nach dem gewählten Maßstab als Quadrat

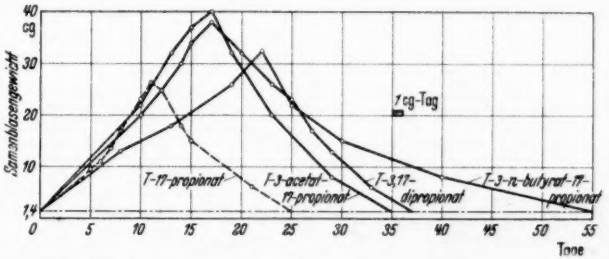


Abb. 6. Wirkung des T-17-propionats (Perandren) und seiner 3-Enolester auf die Samenblasen der kastrierten Ratte im Test mit einmaliger Injektion von 2 mg. (T = Testosteron.)

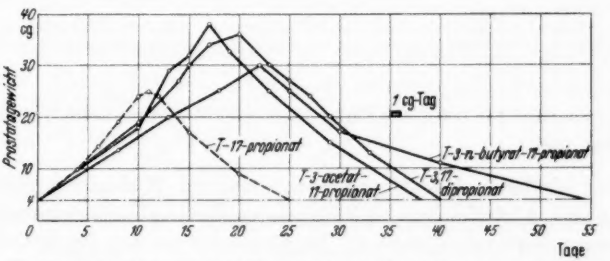


Abb. 7. Wirkung des T-17-propionats (Perandren) und seiner 3-Enolester auf die Prostata der kastrierten Ratte im Test mit einmaliger Injektion von 2 mg. (T = Testosteron.)

oder Rechteck von verschiedenem Ausmaß dargestellt. Die Wirkungsausbeute pro Gewichtseinheit, z. B. pro 1 mg, ergibt den *Leistungsgrad* einer Verbindung.

Im Test mit einmaliger Injektion übertreffen nun alle dargestellten Enolderivate, außer diejenigen des Testosteronisobutyrates, die entsprechenden Monoester. Am ausgesprochensten kommt die Wirkungsverstärkung bei den Enolestern des Testosteron-17-acetats zum Ausdruck, da sich die Wirkungsausbeute des 17-Acetats von 62 cg-Tage durch Bildung des Enolacetats auf 220, des Enol-propionates auf 422 und des

[1] *K. Miescher, C. Scholz* u. *E. Tschopp*, Biochem. J. **32**, 145, 1938; siehe auch *K. Miescher*, Schweiz. med. Wochenschr. **68**, 1345, 1938.

Enol-n-butyrates auf 561 cg-Tage, also bis auf das 9fache, steigern läßt. Diese Zunahme wird im letzteren Falle einerseits durch eine Erhöhung des maximalen Gewichtszuwachses, z. B. bei den Samenblasen von 7,9 auf 23,6 cg, andererseits auch durch Verlängerung der Gesamtwirkungsdauer von 21 auf 41 Tage bedingt. Noch stärker protrahiert ist die Wirkung des 3-Enolbenzoat-17-acetats (48 Tage); der maximale Gewichtszuwachs ist hier jedoch kleiner als beim 3-Butyrat-17-acetat. Gegenüber freiem Testosteron beträgt der Nutzeffekt beim Testo-

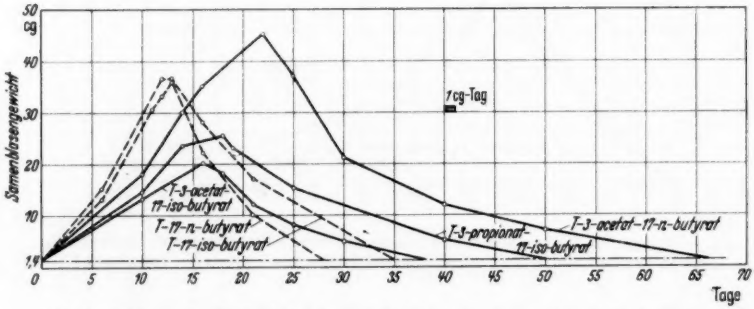


Abb. 8. Wirkung des T-17-n-butyrats und T-17-iso-butyrats und ihrer 3-Enolester auf die Samenblasen der kastrierten Ratte im Test mit einmaliger Injektion von 2 mg. (T = Testosteron.)

steron-17-acetat 11, beim 3-n-Butyrat-17-acetat 97 und beim 3-Benzoat-17-acetat 90.

Eine ähnliche, jedoch prozentual kleinere Wirkungsverstärkung bis auf das 2,5fache läßt sich durch enolisierende Veresterung des Testosteronpropionates erzielen. Im Gegensatz zu den Enolestern des Testosteron-17-acetats steigt aber innerhalb der Enolesterreihe des 17-Propinates mit Erhöhung des Säurerestes in 3-Stellung die Wirkungsausbeute nur noch geringfügig an. Alle drei vom 17-Propionat sich ableitende Enolester besitzen Wirkungsausbeuten von rund 600 cg-Tagen gegenüber einer solchen von 253 cg-Tagen des 17-Monoesters. Von den drei Enolestern zeigte das 3-n-Butyrat-17-propionat zwar den kleinsten maximalen Gewichtszuwachs (Samenblasen 31,1 cg), dafür aber die längste Wirkungsdauer (55 Tage).

Durch Enolisierung von Testosteron-17-n-butyrat mit Essigsäure wird ebenfalls eine Erhöhung der Wirkungsausbeute auf etwa das $2^1/_2$fache erzielt. Das 3-Enolacetat des Testosteron-17-n-butyrats weist mit einer bisher noch nie erreichten Wirkungsausbeute von 1000 cg-Tagen sowohl den größten maximalen Gewichtszuwachs (Samenblasen 43,6 cg♂ als auch die längste Wirkungsdauer (66 Tage)

auf. In Form dieses Esters wird, auf gleiches Gewicht bezogen, das Testosteron 172mal besser ausgenutzt als in freiem Zustand.

Die Enolester des Testosteron-17-iso-butyrates zeigen an den Samenblasen einen geringeren Gewichtszuwachs, dafür eine längere Wirkungsdauer als das 17-iso-Butyrat selbst. Letzteres besitzt aber die höhere Wirkungsausbeute.

Der Vergleich der Werte für den Nutzeffekt der Enolester, bezogen auf die zugrunde liegenden 17-Monoester als Einheit, ergibt eine ziemlich

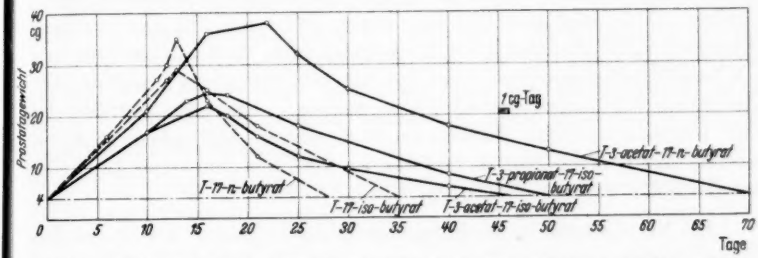


Abb. 9. Wirkung des T-17-n-butyrats und T-17-iso-butyrats und ihrer 3-Enolester auf die Prostata der kastrierten Ratte im Test mit einmaliger Injektion von 2 mg. (T = Testosteron.)

gleichmäßige Wirkungsänderung an den Samenblasen wie an der Prostata. Einzig bei den höheren 3-Enolestern des Testosteron-17-acetats tritt die Wirkungsvermehrung bei der Prostata weniger in Erscheinung als bei den Samenblasen.

Tabelle III. Rangfolge der geprüften Verbindungen.

Präparat	Kapaunen-kamm-Test	10-Tage-Test (Samenblasen)	Test mit einmaliger Injektion, 2 mg (Samenblasen)
Testosteron (T)	1	12	15
T- 17-acetat	2a	3	14
T-3-acetat- 17- „	3	4	13
T-3-propionat- 17- „	4a	5	9
T-3-n-butyrat- 17- „	6a	8b	5
T-3-benzoat- 17- „	9	11	7
T- 17-propionat	2b	2	12
T-3-acetat- 17- „	4b	6	4
T-3-propionat- 17- „	5	7	3
T-3-n-butyrat- 17- „	8	9	2
T- 17-n-butyrat	6b	1	10
T-3-acetat- 17- „	10	8a	1
T- 17-isobutyrat ...	7	—	6
T-3-acetat- 17- „ ...	11a	10	11
T-3-propionat- 17- „ ...	11b	13	8

Tabelle III gibt eine Zusammenstellung der nach den drei Testen ermittelten Rangfolgen der von uns geprüften Verbindungen. Dabei ist im Kapaunenkammtest die internationale Einheit, im 10-Tage-Test die Gewichtszunahme und im einzeitigen Test die Wirkungsausbeute berücksichtigt worden.

Testosteron selbst steht nur im Kapaunenkammtest an erster Stelle, bei den anderen Testen aber auf den letzten Rängen. Während die Testosteron-17-monoester besonders im 10-Tage-Test an der Ratte die ersten Plätze belegen, fallen sie im Test mit einmaliger Injektion stark zurück. Ganz allgemein läßt sich sagen, daß innerhalb der einzelnen Esterreihen die Rangfolge im Kapaunenkamm- und 10-Tage-Test mit wachsendem Enolsäurerest sinkt, im Test mit einmaliger Injektion (mit Ausnahme der Isobutyratreihe) aber ansteigt. Besonders auffällig ist der Unterschied beim Testosteron-17-n-butyrat und seinem 3-Enolacetat. Im 10-Tage-Test ist ersteres, im Test mit einmaliger Injektion letzteres das wirksamste Derivat.

Die Verzögerung im Wirkungsanstieg der Enolester, wie sie bei den beiden zuerst genannten Testen zutage tritt, macht sich im einzeitigen Test weniger stark bemerkbar, mit Ausnahme der 17-n-Butyrat- und besonders der 17-Isobutyrat-Reihe, wo ein verlangsamtes Wachstum deutlich erkennbar ist.

Schon in unserer letzten Arbeit wiesen wir an dieser Stelle darauf hin, daß die Kennzeichnung einer Substanz nach internationalen Einheiten allein ein sehr unvollständiges Bild ihrer Wirksamkeit geben würde. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen erneut, wie notwendig es ist, die Prüfung nach verschiedenen Gesichtspunkten durchzuführen.

Der Leistungsgrad (Wirkungsausbeute pro 1 mg) ist in Tabelle II nicht besonders vermerkt. Er entspricht im vorliegenden Falle jeweils der halben Wirkungsausbeute. Variiert man die Dosen, so ergeben sich außerordentlich interessante Zusammenhänge zwischen der verabfolgten Dosis einerseits und Wirkungsausbeute, Leistungsgrad und Nutzeffekt andererseits. Hierüber wird an anderem Orte eingehender berichtet[1].

Zusammenfassung.

1. Es wird die Herstellung von 8 asymmetrischen Enoldiestern des Testosterons beschrieben und die Wirkung dieser Ester sowie zweier bekannter symmetrischer Enolderivate mit derjenigen normaler Testosteronester sowie von freiem Testosteron verglichen.

[1] *K. Miescher*, Schweiz. med. Wochenschr. **68**, 1345, 1938.

2. Im Kapaunenkammtest (internationale Einheit) erscheinen alle Enolester weniger wirksam als entsprechende normale 17-Monoester. Das Wirkungsmaximum wird später erreicht.

3. Auch im 10-Tage-Test an der kastrierten männlichen Ratte stehen die Enolderivate hinter entsprechenden 17-Monoestern in der Wirkung zurück.

4. Im Test mit einmaliger Injektion überragen dagegen die Enoldiester bezüglich Nutzeffekt und Wirkungsausbeute die zugrunde liegenden 17-Monoester. Im allgemeinen steigt die Wirkungsausbeute bei wachsendem Enolsäurerest. Bei einer Wirkungsausbeute von 1000 cg-Tagen und einem Nutzeffekt von 172 (gegenüber freiem Testosteron = 1) erweist sich in diesem Test das Testosteron-3-acetat-17-n-butyrat als der weitaus wirksamste unter allen Vertretern der männlichen Sexualhormone.

5. Für die vorliegenden Versuche wurde ein Tiermaterial von rund 800 Ratten eingesetzt.

Über die Ausnutzung der Pentosen bei der biologischen Eiweißsynthese.

II. Mitteilung:

Aufstellung von Pentosenbilanzen bei der Züchtung von Torula utilis in synthetischen und technischen Nährsubstraten.

Von

Richard Lechner und **Rudolf Illig.**

(Aus dem Institut für Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 24. November 1938.)

In unserer I. Mitteilung (1) überprüften wir die Analytik der Pentosen, stellten die Leistungsfähigkeit der gewählten Bestimmungsmethode fest und untersuchten den Einfluß der im Holz vorkommenden Kohlenhydrate auf die Genauigkeit der Bestimmung. Erst nachdem die analytischen Grundlagen für die Aufstellung von Pentosenbilanzen gegeben waren, konnten wir an die eigentliche Aufgabe, das Verhalten der Pentosen bei der biologischen Eiweißsynthese, d. h. bei der Züchtung von Torula utilis, zu studieren, herangehen. Wir hatten seinerzeit bereits die Gründe dargelegt, die eine wenigstens teilweise Verwertung und Ausnutzung der Pentosen bei der Futterhefezüchtung wahrscheinlich machten, nämlich die in bezug auf vergärbaren Zucker erhaltenen hohen Ausbeuten an Hefetrockensubstanz und der Umstand, daß die sogenannte Reduktionsdifferenz, d. h. die Menge des während der Züchtung verschwundenen reduzierenden Zuckers größer war als die angewandte Menge an vergärbarem Zucker. Beide Feststellungen, Schwund an reduzierendem Zucker und erhöhter Hefezuwachs ergänzten sich in einer Richtung. Hinsichtlich der erzielten hohen Hefeausbeuten muß noch darauf hingewiesen werden, daß in den technischen Nährsubstraten, in unserem Falle Holzzucker, außer den verschiedenen Zuckern — Aminosäuren spielen keine Rolle — eine Reihe anderer Kohlenstoffverbindungen enthalten sind und daß von *H. Fink*, *J. Krebs* und *R. Lechner* (2) der Beweis für die Ausnutzung einer Reihe einfacher Kohlenstoffverbindungen, z. B. Essigsäure, Acetaldehyd usw., erbracht werden konnte. Mit der Verwertung anderer Kohlenstoffquellen als Zucker muß also gerechnet werden. Ein anderer Unsicherheitsfaktor für die Ausbeuteermittlung in technischen Substraten liegt in der analytischen Bestimmung des vergärbaren Zuckers. Bezüglich des reduzierenden Zuckers ist zu sagen, daß in Holzzuckerlösungen außer der Glucose eine Reihe anderer Zucker und auch reduzierender Nicht-

zuckerstoffe, z. B. Furfurol (3), vorliegen, die bei der Bestimmung des reduzierenden Zuckers als Glucose berechnet werden und zu Beginn einer Gärung mehr reduzierenden Zucker vortäuschen als tatsächlich vorhanden ist.

Es wurden nun in reinen Glucose-Xylosemischungen und in Holzzuckerlösungen eine Reihe von Züchtungen von Torula utilis nach dem Lüftungsverfahren ausgeführt, in jeder Hinsicht bilanziert, wobei besonderes Augenmerk auf die Pentosenbilanz gelegt wurde, und die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz und Roheiweiß bestimmt. Aus den Pentosenbilanzen konnte zunächst festgestellt werden, ob Pentosen angegriffen wurden bzw. verschwunden waren. Als Vergleichsmaßstab für die Ausbeuten dienten die bei der Standardzüchtung (4) für reinen Traubenzucker ermittelten Werte. Für reine Zucker sind bei der Züchtung von Torula utilis bei Einhaltung der vorgeschriebenen Standardbedingungen die praktisch erzielbaren Höchstausbeuten an Hefetrockensubstanz und Roheiweiß eindeutig festgelegt. Auf Grund der für die angewandte Menge an Glucose bzw. an vergärbarem Zucker bei Holzzuckerlösungen zu erwartenden Ausbeuten konnte dann ermittelt werden, ob für eventuell verschwundene Xylose ein entsprechender Zuwachs an Hefetrockensubstanz bzw. Rohprotein eingetreten war oder nicht.

Vergleichsweise wurden auch bei alkoholischen Gärungen von Glucose-Xylosemischungen mit Kulturhefe Pentosenbilanzen aufgestellt, und die Ausbeuten an Alkohol bestimmt. Diese Versuche wurden jedoch nicht weiter ausgedehnt, da bei der vorliegenden Arbeit die Aufklärung der Verhältnisse bei der Hefezüchtung im Vordergrund stand.

Versuchsanstellung.

Für die Herstellung der synthetischen Nährlösungen wurde verwendet: Traubenzucker reinst wasserfrei DAB. 6 von *Schering* und reine Xylose der Deutschen Bergin A.-G.[1].

Als technische Nährsubstrate kamen nach dem *Scholler-Tornesch*-Verfahren und nach dem *Bergius-Rheinau*-Verfahren hergestellte Holzzuckerlösungen zur Anwendung. Die Holzzuckerlösungen nach *Scholler-Tornesch* waren drei verschiedene Durchschnittswürzen und der Holzzucker nach *Bergius-Rheinau* stand als Ablaufsirup der Kristallisation zur Verfügung.

Bei den synthetischen Nährlösungen (Versuche 1 bis 6) war der Anteil der Xylose, auf Glucose bezogen, verschieden, etwa 16, 33 und

[1] Der Deutschen Bergin A.-G., Mannheim-Rheinau, danken wir für die Überlassung reiner Xylose.

38%. In den Holzzuckerlösungen nach *Scholler-Tornesch* (Versuche 7 bis 10) betrug der Xyloseanteil etwa 18 bis 28%, in den Holzzuckerlösungen nach *Bergius-Rheinau* (Versuche 11 und 12) etwa 9% und wurde in zwei weiteren Züchtungen (Versuche 13 und 14) durch Zusatz von reiner Xylose auf etwa 20% erhöht.

Bei den Züchtungen 5 und 6 wurden außerdem Biospräparate zugesetzt. Die Herkunft und genaue Definition der verwendeten Präparate ist bereits von *H. Fink* und *J. Krebs* (4) angegeben worden. Es ist zu erwähnen, daß die Wirksamkeit dieses oder jenes Präparates durch längeres Lagern abgenommen haben kann. Die Präparate wurden gemischt und während der Züchtung in fünf Teilgaben zugesetzt und zwar folgende Mengen:

	Versuch 5 mg	Versuch 6 mg
Vitamin B_1-Chlorhydrat	1,9	2,2
Meso-Inosit inaktiv	14,5	15,8
Biotinpräparat	23,5	17,8

Die Hefezüchtungen wurden in der von *H. Fink*, *R. Lechner* und *J. Krebs* (5) beschriebenen Gärapparatur unter sogenannten Standardbedingungen (4) — festgelegt sind Zuckermenge und -konzentration, Stellhefemenge, Zulaufschema, Gärdauer, Gärtemperatur, Nährsalze usw. — durchgeführt. Jedoch wurde die Nährsalzmenge nicht auf die angewandte Menge Glucose bzw. vergärbaren Zucker allein, sondern auf den Gehalt an Gesamtzuckerstoffen, also einschließlich Xylose, berechnet.

In den synthetischen Lösungen sind die angewandten Zuckermengen durch die Einwaage an Glucose bzw. Xylose gegeben. — Der *reduzierende Zucker* in Holzzucker- und vergorenen Lösungen wurde maßanalytisch nach *Kjeldahl-Bertrand* bestimmt und als Glucose berechnet. — Der *vergärbare Zucker* in Holzzuckerlösungen wurde nach der von *H. Fink*, *R. Lechner* und *E. Heinisch* (6) angegebenen Vorschrift bestimmt, jedoch wurde bei der Neutralisation der Holzzuckerlösungen kein Natriumsulfit zugesetzt und an Stelle von 0,5 g KH_2PO_4 und 10 ccm Malzkeimauszug 3% der Zuckermenge an Nährsalzgemisch, bestehend aus 30,0 g Asparagin, 12,0 g KH_2PO_4 und 0,8 g $MgSO_4$ verwendet. — Die *Pentosen*bestimmung erfolgt nach den von *R. Lechner* und *R. Illig* (1) festgelegten Vorschriften. — Zur *Trockensubstanz*bestimmung in der Hefe wurde etwa 1 g abgepreßte Hefe in ganz dünner Schicht im Wägegläschen verteilt und 4 bis 5 Stunden bei 105° getrocknet. — Zur *Rohprotein*bestimmung wurden etwa 2 g feuchte Hefe — bei Lösungen wurde nach Ansäuern zur Sirupdicke eingedampft — mit etwa 7 g Selenreaktionsgemisch nach *Wieninger* und 30 ccm konz. Schwefelsäure aufgeschlossen und das gebildete Ammoniak wie üblich bestimmt. — Zur *Asche*bestimmung wurden etwa 2 g feuchte Hefe bei 105° vorgetrocknet, dann vorsichtig verascht und geglüht.

Das erhaltene umfangreiche Zahlenmaterial ist der besseren Übersicht wegen nach verschiedenen Gesichtspunkten aufgeteilt.

Pentosenbilanzen.

In der nachstehenden Tabelle I sind die Zusammensetzungen der Nährsubstrate vor und nach der Züchtung sowie die Pentosenbilanzen niedergelegt.

Es sind aufgeführt:

In Spalte 1: Die Nummer der Züchtung.
„ „ 2: Die Art des bei der Züchtung verwendeten Nährsubstrats.
„ „ 3: Die mit dem Nährsubstrat angewandten Mengen an reduzierendem und vergärbarem Zucker bzw. Glucose, die Menge des bei der Züchtung verschwundenen reduzierenden Zuckers, die sogenannte Reduktionsdifferenz und die angewandte Xylosemenge.
„ „ 4: Die angewandte Xylosemenge, ausgedrückt in Hundertteilen des angewandten vergärbaren Zuckers bzw. der Glucose.

Tabelle I.

1	2	3				4	5	6		7	
Versuch Nr.	Art des Substrats	Angewandter Zucker in g				Xyloseanteil in % des vergärbaren Zuckers bzw. der Glucose	Xylosekonzentration bei der Züchtung	g Zucker nach der Züchtung		Xyloseschwund während der Züchtung	
		reduzierender	vergärbarer bzw. Glucose	Reduktionsdifferenz	Xylose			reduzierender	Xylose	in g	in % der angewandten Xylose
1	Glucose + Xylose		52,50		17,50	33,3	0,25	13,58	14,81	2,69	15,4
2			52,50		17,50	33,3	0,25	13,20	14,57	2,93	16,7
3			48,70		18,62	38,2	0,27	14,05	15,13	3,49	18,8
4			48,70		18,62	38,2	0,27	13,76	14,64	3,98	21,4
5			58,44		9,46	16,2	0,14	7,83	7,56	1,90	20,1
6			58,44		9,46	16,2	0,14	7,22	7,51	1,95	20,6
7	Holzzuckerlösungen (*Scholler-Tornesch*-Verfahren)	83,0	65,8	71,9	13,0	19,8	0,19	11,1	7,15	5,85	45,0
8		83,0	65,8	73,1	13,0	19,8	0,19	9,9	6,75	6,25	48,1
9		189,8	157,0	171,0	28,7	18,3	0,40	18,8	8,97	19,73	68,8
10		189,8	140,9	169,8	39,2	27,8	0,52	20,0	9,20	30,00	76,6
11	Holzzuckerlösungen (*Bergius-Rheinau*-Verfahren)	76,2	68,3	67,7	6,01	8,8	0,16	8,46	3,56	2,45	40,8
12		70,8	63,5	62,1	5,47	8,6	0,14	8,70	3,95	1,52	27,8
13	Holzzuckerlösungen (*Bergius-Rheinau*-Verfahren) + Xylose		58,5		11,52	19,7	0,30	12,70	7,89	3,63	31,5
14			62,3		12,20	19,6	0,32	11,70	6,22	5,98	49,0

In Spalte 5: Die Xylosekonzentration bei der Züchtung, bezogen auf das Gesamtvolumen am Ende der Gärung.
„ „ 6: Die nach der Züchtung noch vorhandenen Mengen an reduzierendem Zucker und an Xylose.
„ „ 7: Die bei der Züchtung verschwundene Xylosemenge, ausgedrückt in g und in Hundertteilen der angewandten Xylosemenge.

Zunächst ist die Tatsache festzustellen, daß bei allen Züchtungen ein Teil der angewandten Xylose verschwunden ist. Analytisch ist jedenfalls von der zu Beginn der Züchtung vorhandenen Pentosenmenge nach Beendigung der Lüftungsgärung nur mehr ein Teil nachzuweisen.

Bei den Versuchen mit reinen Zuckerlösungen verschwand etwa ein Fünftel der Xylose, unabhängig von der angewandten absoluten Menge und von dem auf Glucose bezogenen Xyloseanteil. Bedeutend größer war der Xyloseschwund bei den Holzzuckerlösungen. Er betrug etwa 30 bis 80% der ursprünglichen Xylosemenge. Der größte Schwund war bei den höchsten absoluten Xylosemengen festzustellen, jedoch kann auf Grund der vorliegenden Versuche nicht allgemein behauptet werden, daß mit steigender Xylosemenge oder Vergrößerung des Xyloseanteils der Xyloseschwund proportional wächst. Ein Zusammenhang der Xylosekonzentration während der Züchtung mit der verschwundenen Xylosemenge ist auch nicht vorhanden, obwohl auch hier bei der höchsten Konzentration der Schwund am größten war. Die großen Schwankungen im Xyloseschwund sind bei Holzzuckerlösungen, vor allem bei den nach dem *Scholler-Tornesch*-Verfahren hergestellten, vielleicht auf wechselnden Gehalt an Furfurol und Hexuronsäuren zurückzuführen. So wird z. B. das Furfurol während der Lüftung umgewandelt und dadurch ein Xyloseschwund vorgetäuscht.

Bei den vergorenen synthetischen Nährlösungen liegt der Gehalt an reduzierendem Zucker mit einer Ausnahme niedriger als der Xylosewert, ist aber dem Xylosewert ungefähr proportional. Auf die Reduktionsbestimmung von Xylose soll in der folgenden Mitteilung näher eingegangen werden. In allen vergorenen Holzzuckerlösungen übersteigt der Wert des reduzierenden Zuckers den für Xylose erhaltenen beträchtlich. Es sind also außer Xylose noch andere reduzierende Stoffe anwesend. Die Reduktionsdifferenz ist bei den Holzzuckerlösungen nach *Scholler-Tornesch* immer größer als der Wert für den vergärbaren Zucker. Die Differenz entspricht ungefähr dem festgestellten Xyloseschwund. Bei Holzzuckerlösungen nach *Bergius-Rheinau* ist die Reduktionsdifferenz, soweit sie ermittelt wurde, um ein geringes kleiner als die Menge des vergärbaren Zuckers.

Ausbeuten.

Wenn die bei der Züchtung verschwundene Xylose von der Hefe zum Zellaufbau verwendet wird, müßte bei den vorhin erwähnten

Tabelle II.

Tabelle II.

1	2			3				4				5		6					
Versuch	Angewandter Zucker in g			Stellhefe				Erntehefe				Zuwachs an		Ausbeuten, bezogen auf					
					Rohprotein				Rohprotein					Red. Zucker		vergärb. Zucker		Red.-Differenz	
Nr.	reduzierender	vergärbarer	Reduktionsdifferenz	Trockensubstanz g	%	g	Asche %	Trockensubstanz g	%	g	Asche %	Hefetrockensubstanz g	Rohprotein g	Hefetrockensubstanz	Rohprotein	Hefetrockensubstanz	Rohprotein	Hefetrockensubstanz	Rohprotein
1		52,50		5,04	55,5	2,80	6,22	31,32	56,5	17,69	9,85	26,28	14,89			50,0	28,3		
2		52,50		5,04	55,5	2,80	6,22	31,39	55,0	17,26	10,17	26,35	14,46			50,1	27,5		
3		48,70		4,97	56,1	2,79	7,85	29,47	56,0	16,49	8,00	24,50	13,70			50,0	28,0		
4		48,70		5,13	55,9	2,86	8,49	30,20	54,6	16,49	6,95	25,07	13,63			51,5	28,0		
5		58,44		5,19	57,7	2,99	5,36	33,12	57,9	19,18	9,89	27,93	16,19			47,8	27,7		
6		58,44		5,19	57,7	2,99	5,36	33,40	57,0	19,04	9,52	28,21	16,05			48,3	27,5		
7	83,0	65,8	71,9	4,95	54,5	2,70	6,72	38,53	56,1	21,60	9,41	33,58	18,90	40,5	22,8	51,0	28,7	46,7	26,3
8	83,0	65,8	73,1	4,95	54,5	2,70	6,72	37,22	55,1	20,52	9,53	32,27	17,82	38,9	21,5	49,0	27,1	44,1	24,4
9	189,8	157,0	171,0	9,68	56,6	5,48	7,59	81,60	57,2	46,70	6,54	71,92	41,20	37,9	21,7	45,8	26,2	42,0	24,1
10	189,8	140,9	169,8	9,68	56,6	5,48	7,59	84,50	56,5	48,75	7,53	74,82	43,27	39,4	22,8	53,1	30,7	44,0	25,5
11	76,2	68,3	67,6	4,95	61,2	3,03	8,06	39,97	53,1	21,20	6,45	35,02	18,17	46,0	23,8	51,3	26,6	51,8	26,8
12	70,8	63,5	62,5	4,62	56,5	2,61	8,20	38,15	56,5	21,55	6,42	33,53	18,94	47,4	26,7	52,8	29,8	54,0	30,5
13		58,5		5,02	57,7	2,90	7,30	39,20	59,5	23,32	7,50	34,18	20,42			58,4	34,9		
14		62,3		5,24	60,2	3,16	7,96	41,40	55,6	23,02	7,90	36,16	19,86			58,0	31,8		

Versuchen eine höhere Hefeausbeute erhalten werden als auf Grund des angewandten vergärbaren Zuckers bzw. der Vergleichsversuche mit Glucose zu erwarten war. Einwandfrei läßt sich dies wieder nur bei reinen Zuckern feststellen, denn in den Holzzuckerlösungen ist die Bestimmung des vergärbaren Zuckers immerhin mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

Die Hefetrockensubstanz- bzw. Rohproteinausbeuten aus reinem Traubenzucker betragen bei den Standardzüchtungen 50 bis 52% bzw. 27 bis 30%. Diese Ausbeuten müßten also bei Mitverwertung von Xylose wesentlich überschritten werden.

In der Tabelle II sind die Ausbeutezahlen wiedergegeben.

Es sind aufgeführt:

In Spalte 1: Die Nummer der Züchtung.
„ „ 2: Die bei der Züchtung angewandten Mengen an reduzierendem und vergärbarem Zucker und die Reduktionsdifferenz.
„ „ 3: Die Menge und Zusammensetzung der Stellhefe.
„ „ 4: Die Menge und Zusammensetzung der Erntehefe.
„ „ 5: Der bei der Züchtung eingetretene Zuwachs an Hefetrockensubstanz und Roheiweiß.
„ „ 6: Die Hefetrockensubstanz- und Roheiweißausbeuten, bezogen auf den angewandten reduzierenden und vergärbaren Zucker und auf die Reduktionsdifferenz.

Bei den mit reinen Zuckern durchgeführten Züchtungen sind die Ausbeuten normal. Sie entsprechen den für reinen Traubenzucker ermittelten Werten. Es ist in keinem Falle eine Ausbeuteerhöhung festzustellen. Die Züchtungen 5 und 6, bei denen Biospräparate zugesetzt wurden, zeigen, daß auch bei Anwesenheit von Biosstoffen die Xylose von Torula utilis nicht ausgenutzt werden kann. Die Versuche mit synthetischen Nährlösungen ergeben keinen Anhaltspunkt für die Annahme einer Ausnutzung von Xylose durch Torula utilis.

Bei den Züchtungen in Holzzuckerlösungen nach *Scholler-Tornesch* liegen die Hefe- und Rohproteinausbeuten ebenfalls auf der gleichen Höhe wie die Standardwerte, bei einem Versuch sogar etwas darunter. Die Versuche 11 und 12 in Holzzuckerlösungen nach *Bergius-Rheinau* ergaben, auf vergärbaren Zucker bezogen, ebenfalls normale Ausbeuten, dagegen sind bei den Züchtungen 13 und 14 mit denselben Holzzuckerlösungen, aber mit Zusatz von reiner Xylose, wesentlich höhere Ausbeuten erhalten worden. Diese beiden letzten Versuche sprechen wieder für eine Ausnutzung der Pentosen durch Torula utilis und stimmen mit verschiedenen Beobachtungen bei der technischen Herstellung von Futterhefe überein.

Alkoholgärung mit Kulturhefe.

Nach den bei der Hefezüchtung im Lüftungsverfahren gemachten Erfahrungen interessierte vergleichsweise das Verhalten der Pentosen

bei der alkoholischen Gärung mit Kulturhefe. Es war zu prüfen, ob dabei ebenfalls ein Xyloseschwund eintritt und wenn, ob dann eine höhere Alkoholausbeute erhalten wird.

Nachstehend sind einige Versuche aufgeführt, bei denen Glucose allein und zusammen mit Xylose der alkoholischen Gärung unter völlig gleichen Bedingungen unterworfen wurde. In den vergorenen Substraten wurde der Alkoholgehalt und teilweise auch der Gehalt an reduzierendem Zucker und Xylose bestimmt. Die Gärungen wurden nach der für die Bestimmung des vergärbaren Zuckers gegebenen Vorschrift durchgeführt. Es wurden jeweils 19,87 g Glucose (Versuche 1 bis 4) und bei einem Teil der Versuche (5 bis 8) zusätzlich 4,83 g Xylose in 500 ccm Leitungswasser gelöst, nach Zugabe von 0,6 g Nährsalzgemisch mit 4 g abgepreßter Kulturhefe (Rasse M) vergoren. Die Gärungen 1, 2, 5 und 6 wurden bei 32° unter öfterem Umschütteln während 72 Stunden, die Gärungen 3, 4, 7 und 8 im Schütteltthermostaten bei 32° in 27 Stunden vergoren. Nur bei den Gärungen 7 und 8 wurde in der vergorenen Lösung der Xylosegehalt bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III.

1	2	3			4	5	
Versuch Nr.	Art des Substrats	Vergorene Lösung			Alkoholausbeute	Während der Gärung verschwundene Xylose	
		Alkohol g	Reduzierender Zucker g	Xylose g	%	in g	in % der angewandten Xylose
1	Glucose	8,63	nicht bestimmt	—	85,1	—	—
2	Glucose	8,39	nicht bestimmt	—	82,7	—	—
3	Glucose	8,36	0,07	—	82,5	—	—
4	Glucose	8,36	0,07	—	82,5	—	—
5	Glucose + Xylose	8,45	nicht bestimmt		83,3	nicht bestimmt	
6	Glucose + Xylose	8,46	„	„	83,4	„	„
7	Glucose + Xylose	8,51	4,18	4,45	84,0	0,38	7,9
8	Glucose + Xylose	8,59	4,20	4,48	84,7	0,35	7,2

Es sind aufgeführt:

In Spalte 1: Die Nummer der Gärung.
„ „ 2: Die Zusammensetzung des Gärsubstrats.
„ „ 3: Der Gehalt der vergorenen Lösung an Alkohol, reduzierendem Zucker und Xylose.
„ „ 4: Die nach der Gärung gefundene Alkoholmenge, ausgedrückt in Hundertteilen der theoretisch für die angewandte Glucose nach der *Gay-Lussac*schen Gleichung zu erwartenden Alkoholmenge.
„ „ 5: Die bei der Gärung verschwundene Xylosemenge, ausgedrückt in g und in Hundertteilen der angewandten Xylosemenge.

Die Alkoholausbeuten bei den mit Xylosezusatz durchgeführten Gärungen sind um einen ganz geringen Betrag höher als bei den reinen Glucosegärungen. Es ist aber nicht zulässig, daraus ohne weiteres den Schluß zu ziehen, daß Xylose zur Alkoholbildung mit ausgenutzt wurde, denn die Alkoholausbeuten unterliegen immer gewissen Schwankungen. So können z. B. gegenwärtig mit der Brennereihefe Rasse M die früher (5) aus Glucose erhaltenen Alkoholausbeuten von 88% nicht immer erreicht werden.

Bei der alkoholischen Gärung ist von der anfangs vorhandenen Pentosenmenge am Ende der Gärung ein Teil nicht mehr nachzuweisen. Der Xyloseschwund ist aber nicht so groß wie bei der Hefezüchtung mit Torula utilis. Das Ergebnis stimmt mit Erfahrungen bei der Vergärung von Holzzuckerlösungen mit Kulturhefen überein. Der Reduktionsvergärungsgrad liegt nämlich dabei höher als der Vergärungsgrad.

Die Versuche zur Aufklärung der Ursache des Xyloseschwundes und der Verhältnisse in den Holzzuckerlösungen werden fortgesetzt.

Zusammenfassung.

1. Bei der Züchtung von Torula utilis in Glucose-Xylosemischungen im Lüftungsverfahren ist am Ende der Gärung ein Teil der ursprünglich angewandten Pentosenmenge analytisch nicht mehr nachzuweisen. Ein dem Xyloseschwund entsprechender Hefezuwachs war in keinem Falle festzustellen. Die Versuche in synthetischen Nährlösungen ergaben keinen Anhaltspunkt für die Annahme einer Verwertung von Xylose durch Torula utilis.

2. In Holzzuckerlösungen war der Xyloseschwund, auf die angewandte Xylosemenge bezogen, größer als in den synthetischen Nährlösungen. Die Hefeausbeuten lagen teils bei dem auf Grund des angewandten vergärbaren Zuckers erwarteten Wert, teils übertrafen sie ihn. Einen Rückschluß für oder gegen die Ausnutzung von Pentosen lassen die Versuchsergebnisse nicht zu.

3. Auch bei der alkoholischen Gärung von Glucose-Xylosemischungen mit Kulturhefen tritt ein Xyloseverlust ein, ohne daß der Beweis für einen entsprechenden Mehrertrag an Alkohol erbracht werden konnte.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung eines Stipendiums an den einen (*R. Illig*) von uns.

Literatur.

1) *R. Lechner* u. *R. Illig*, diese Zeitschr. **299**, 174, 1938. — 2) *H. Fink*, *J. Krebs* u. *R. Lechner*, ebenda **290**, 135, 1937. — 3) *H. Lüers*, Zeitschr. f. Spiritusindustrie **60**, 7, 1937. — 4) *H. Fink* u. *J. Krebs*, diese Zeitschr. **299**, 1, 1938. — 5) *H. Fink*, *R. Lechner* u. *J. Krebs*, ebenda **299**, 28, 1938. — 6) *H. Fink*, *R. Lechner* u. *E. Heinisch*, ebenda **283**, 71, 1935.

Über den Chlorophyllverlust trocknender Laubblätter und über Chlorophyllextraktion.

Von

N. T. Deleano und J. Dick.

(Aus dem Laboratorium für analytische Chemie der Universität in Bukarest.)

(Eingegangen am 21. November 1938.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Bei der Bestimmung des Chlorophyllgehaltes einer Pflanze ist es von größter Wichtigkeit, in welcher Zeit nach dem Sammeln die Probe zur Analyse gelangt. Nach unseren Beobachtungen dürfte sogar der geringste Zeitverlust von weitgehendem Einfluß auf die Analysenergebnisse sein.

Bekanntlich zersetzt sich das Chlorophyll in kolloider Lösung durch die Einwirkung des Lichtes. Im Zusammenhang damit bestimmten wir das Chlorophyll im Laube einer Bruchweide einerseits sofort nach dem Sammeln der Blätter, andererseits nach verschieden langer Einwirkung des Sonnenlichtes, nach Aufbewahren im Schatten und Dunkeln und Trocknen im Trockenschrank bei steigenden Temperaturen.

Die Analysenergebnisse sind in der Tabelle zusammengefaßt. Aus ihnen geht eindeutig hervor, daß das Chlorophyll in den Laubblättern während dem Trocknen nicht nur durch höhere Temperatur, sondern auch durch das Licht, ja selbst beim Aufbewahren im Dunkeln zerstört wird.

Im Sonnenlicht büßen die völlig entwickelten Blätter bei 34 bis 38° C nach 3 Stunden schon 4,5% ihres Chlorophyllgehaltes ein. Nach 6 Stunden erreicht dieser Schwund 9,4% usw. und nach 120 Stunden 43% des Chlorophyllgehaltes der grünen Blätter. Bei noch längerem Trocknen im Sonnenlicht scheint keine weitere Zersetzung stattzufinden. Da die Blätter während der Nacht nicht beleuchtet wurden, trockneten sie bei der über 12 Stunden hinausgehenden Einwirkung abwechselnd etwa je 12 Stunden im Sonnenlicht und im Dunkeln.

Es soll noch bemerkt werden, daß sowohl hellgrüne, noch nicht völlig ausgewachsene, wie auch die herbstlich vergilbten Blätter im Sonnenlicht kleinere Mengen ihres Chlorophyllgehalts einbüßen, ohne daß eine Beziehung zu dem absoluten Chlorophyllgehalt zu bestehen scheint.

Im Schatten ist die Zersetzung des Chlorophylls bedeutend geringer. In den ersten 3 Stunden beträgt der Schwund bei 23° C bloß

2,2%. Nach längerem Trocknen — 96 Stunden — erreicht aber der Verlust auch hier etwa 20%.

Auch in den im Dunkeln aufbewahrten Blättern zerfällt das Chlorophyll, aber erst nach längerem Trocknen. Hier weist der Chlorophyllgehalt nach 8 Stunden einen Schwund von noch kaum 1% auf. Nach

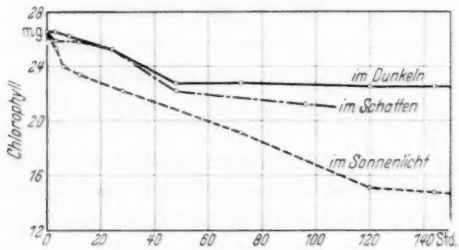


Abb. 1.

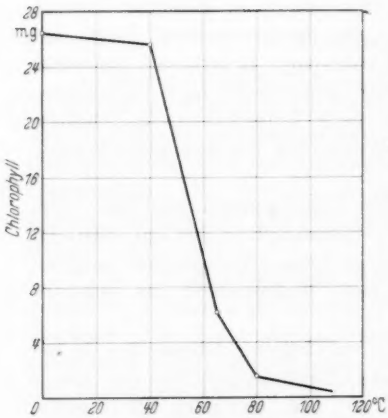


Abb. 2.

120 Stunden zersetzen sich hier 15% des Chlorophylls. Bei noch längerem Trocknen findet keine weitere Zersetzung statt.

Im Trockenschrank werden in 6 Stunden bei 40° C 3,4% des Chlorophylls zerstört. Bei höherer Temperatur zersetzt sich das Pigment sehr leicht. Der Schwund beträgt bei 65° C in 6 Stunden schon 76,6%. Bei 80° C bleiben nach 6 Stunden kaum einige Prozente des Chlorophylls intakt und bei 110° C sind nach 6 Stunden kaum mehr Spuren des Pigments vorhanden; bei 130° C wird es restlos zerstört.

In Abb. 1 ist die Einwirkungszeit (Trocknen) im Sonnenlicht, Dunkeln und Schatten in Stunden auf die Abszisse und der Chlorophyllgehalt in mg für 100 g Frischgewicht auf die Ordinate aufgetragen. Aus Abb. 2 ist der Chlorophyllschwund bei verschiedenen Temperaturen bei einem je 6 Stunden langem Trocknen ersichtlich. Auf der Abszisse ist die Temperatur in ° C aufgetragen.

Vergleicht man den Chlorophyllschwund der im Sonnenlicht und der im Trockenschrank je 6 Stunden bei etwa 40° C aufbewahrten Blätter, so ergibt sich, daß bei 34 bis 40° C die Temperatur nur einen geringen Einfluß auf die Chlorophyllzersetzung ausübt; im Trockenschrank

werden bei 40° C in 6 Stunden nur 3,4%, bei 34 bis 38° C in derselben Zeit im Sonnenlicht aber 9,4% des Chlorophylls zerstört. Diese Differenz muß also dem Einfluß des Lichtes zugeschrieben werden.

Während es bei der Zersetzung des Chlorophylls durch das Licht im wesentlichen auf photodynamische Wirkung, vielleicht Oxydationsprozesse, oder auf eine Störung der Addition der Kohlensäure an Chlorophyll ankommt, kann die Zersetzung des Pigments im Dunkeln vielleicht auf die Wirkung der Oxydasen, der organischen Säuren, evtl. des traumatischen Reizes[1] zurückgeführt werden.

Chlorophyllverlust der Laubblätter

Datum 1938	Angewandt δ-Bruchweideblätter g	Getrocknet Std.	Temp. °C	Wasserverlust %	Gewogen $MgNH_4AsO_4 \cdot 6H_2O$ mg	Gefunden Chlorophyll *a* mg	Chlorophyllschwund mg	Chlorophyllschwund %
Im Sonnenlicht.								
1. VI.	10	frisch	—	—	8,6	26,5	—	—
	10	3	36—38	66	8,2	25,3	1,2	4,5
	10	6	36—38	66	7,8	24,0	2,5	9,4
	10	12	34—38	66	7,6	23,4	3,1	11,7
	10	28	23—38	66	7,2	22,2	4,3	16,2
	10	72	23—38	66	6,2	19,1	7,4	27,9
	10	120	23—38	66	4,9	15,1	11,4	43,0
	10	144	23—38	66	4,8	14,8	11,7	44,1
Im Schatten.								
1. VI.	10	3	23	22	8,4	25,9	0,6	2,2
	10	12	23,5	48	8,4	25,9	0,6	2,2
	10	24	23,5	63	8,2	25,3	1,2	4,5
	10	48	23,5	65	7,2	22,2	4,3	16,2
	10	96	23,5	66	6,9	21,2	5,2	19,6
Im Dunkeln.								
1. VI.	10	3	20	20	8,6	26,5	—	—
	10	8	20	36,5	8,5	26,2	0,3	1,1
	10	24	20	63	8,2	25,3	1,2	4,5
	10	48	20,5	63	7,4	22,8	3,7	14,0
	10	72	20,5	63	7,4	22,8	3,7	14,0
	10	120	20,5	65	7,3	22,5	4,0	15,1
	10	144	20,5	65	7,3	22,5	4,0	15,1
Im Trockenschrank.								
1. VI.	10	6	40	63	8,3	25,6	0,9	3,4
	10	6	65	66	2,0	6,2	20,3	76,6
	10	6	80	66	0,5	1,54	24,96	94,2
	10	6	110	66	Spuren	—	—	—
	10	6	130	66	—	—	—	—

[1] *A. Meyer* u. *N. T. Deleano*, Zeitschr. f. Bot. **3**, 657—701, 1911; **5**, 209—320, 1913.

Will man also das Chlorophyll einer Pflanze oder eines Pflanzenorgans quantitativ messen, so muß das sofort geschehen. Die gesammelten Proben müssen beim Transport oder evtl. nötigem Aufbewahren im Laboratorium mit einer dunklen Hülle (Tuch) umgeben, an einem kühlen Ort aufgehoben und so rasch als möglich analysiert werden.

Das Chlorophyll wurde nach unserem Verfahren auf gewichtsanalytischem Wege bestimmt[1]. (Kolorimetrische Bestimmungen geben unbrauchbare Ergebnisse infolge der Bildung von Phäophytin.) Das Pigment wird zu diesem Zwecke sowohl aus grünen als auch getrockneten Blättern mit Alkohol extrahiert.

Vor kurzem beschrieb *F. Rogoziński*[2] die Bestimmung des Chlorophylls nach unserem Verfahren, meint aber, daß aus trockenen Blättern nur ein Teil des Chlorophylls mit Alkohol extrahiert werden kann und empfiehlt Aceton zu diesem Zweck nach einer Vorextraktion mit 30 %igem Aceton. *Rogoziński* benutzt zu seinen Extraktionen 90%igen Alkohol und nicht 95%igen nach unserer Vorschrift. Da wir bei der ersten Beschreibung unseres Verfahrens nur über die Bestimmung bzw. Extraktion des Chlorophylls mit Alkohol aus grünen Blättern berichten, stellten wir jetzt auch einige Versuche mit trockenen Blättern an.

5 bis 10 g trockener Silberpappelblätter, die im Jahre 1933 (6. und 24. August, 15. September), wie auch Zea-Maisblätter, die am 19. Juli 1933 gesammelt waren und damals z. T. bei 60° C, z. T. an der Luft und dann im Exsikkator vollends getrocknet und grob zermahlen worden waren, haben wir in einem Mörser mit Glassplittern weiter zerrieben und in kleinen Portionen mit 95 %igem (im ganzen mit 300 bzw. 500 ccm für 5 bzw. 10 g Blattpulver) Alkohol extrahiert. Beim Beginn bleibt das Blattpulver längere Zeit (etwa 2 Stunden) und bei jedem weiteren Ausziehen etwa 10 bis 15 Minuten lang mit dem Alkohol stehen. Der letzte Auszug ist nur mehr sehr schwach grün gefärbt. Extrahiert man nun dieselbe Probe weiter mit kleinen Portionen Aceton — insgesamt etwa 100 ccm —, so ist die Acetonlösung um nichts mehr gefärbt als der letzte alkoholische Auszug. Vergleicht man den Acetonauszug mit dem Gesamtalkoholauszug kolorimetrisch, so ergibt sich, daß in ersterem höchstens 1,5 % des Gesamtchlorophylls enthalten sind.

Verfährt man umgekehrt, extrahiert man also zuerst mit kleinen Portionen Aceton unter gleichen Bedingungen (mit insgesamt 300 bzw. 500 ccm), so ist der letzte Auszug ebenfalls noch sehr schwach grün gefärbt. Zieht man nun weiter mehrmals mit insgesamt etwa 100 ccm Alkohol aus, so ist letzterer sogar bedeutend grüner gefärbt als der Acetonauszug, der nach der Alkoholextraktion erhalten wurde. Dieser Teil verhält sich zum Gesamtchlorophyll wie 1 zu 100. (Alkoholische Chlorophyllösungen sind dunkelgrüner gefärbt als acetonische Lösungen in entsprechender Konzentration.)

[1] *N. T. Deleano* u. *J. Dick*, diese Zeitschr. **268**, 317, 1934. — [2] *F. Rogoziński*, Sur le dosage gravimétrique de la chlorophylle, Bull. de l'Acad. Polonaise d. Sc. et d. Lettr., Série A, 483, 1937.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Extraktionsverfahren mit Alkohol auch bei trockenen Blättern mit ebenso gutem Erfolg benutzt werden kann wie das Acetonverfahren. *Vollkommen farblos* wird weder der letzte Alkohol- noch der letzte Acetonauszug, auch dann nicht, wenn man mit insgesamt je 300 ccm der Lösungsmittel in kleinen Portionen *weiter*extrahiert.

Wir ziehen aber Alkohol als Extraktionsmittel auch aus folgendem Grund vor. Bei einem Vorextrahieren mit 30%igem Aceton besteht die Gefahr, daß das Chlorophyll durch hydrolytische Spaltung merklich Magnesium verliert. Da wir nach unserem Verfahren aber das Magnesium bestimmen, muß stets das intakte Chlorophyll erfaßt und sein Abbau in der Lösung zu Phäophytin und $MgCO_3$ bzw. $Mg(HCO_3)_2$ verhindert werden. Nimmt man an, daß der Zersetzung des Chlorophylls eine Addition vorausgeht, wobei das Chlorophyll ein Additionsprodukt mit Kohlensäure bildet, so wird das Chlorophyll in einer Lösung, in der die Konzentration des organischen Lösungsmittels unter einer gewissen Grenze bleibt, teilweise in Phäophytin und $MgCO_3$ bzw. $Mg(HCO_3)_2$ zerfallen, besonders in sehr verdünnten Lösungen. Dabei wird das Additionsprodukt des Chlorophylls *a* leichter zersetzt als jenes von Chlorophyll *b*. In einer alkoholischen Lösung aber dissoziiert die Kohlensäureverbindung des Chlorophylls in Chlorophyll und CO_2. Schon in einer 80%igen alkoholischen Lösung bleibt der Magnesiumkomplex tagelang intakt (*Willstätter* und *Stoll*).

Zur Kenntnis reduzierender Zucker. V.[1]

Von

Wł. Bednarczyk und **L. Marchlewski.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Laboratorium der Jagiell. Universität in Kraków.)

(Eingegangen am 12. November 1938.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In früheren Mitteilungen[2] hat einer von uns mit seinen Mitarbeitern gezeigt, daß Aldosen und reduzierende Polysaccharide keine selektive Absorption kurzwelligen Lichtes verursachen, was mit der Annahme übereinstimmt, daß sie keine freien Aldehydgruppen im Molekül enthalten. Von den Ketosen wurde bis jetzt nur die Lävulose untersucht. Frühere mit *Kwieciński* ausgeführte Versuche zeigten, daß Lävulose selektive Absorption aufweist, und dieser Befund wurde später an besonders gereinigten Präparaten von uns bestätigt[3]. Trotzdem war es angezeigt, diesen Befund durch das Studium anderer Ketosen zu erhärten. Wir wählten die Sorbose, welche leichter rein zu erhalten ist als Lävulose.

Als Ausgangsprodukt diente Sorbose der Werke *Hoffmann-La Roche* in Basel. Das Originalpräparat schmolz bei 164,5 bis 165,0° C. Es wurde in wässeriger Lösung mit dem *Spekker-Hilger*schen Spektrophotometer und unter Anwendung eines Funkens von hoher Spannung zwischen Stahl-Wolframelektroden als Lichtquelle optisch untersucht.

Konzentration $c = 0{,}5$ Mol, Schichtdicke $d = 2$ cm.

α	λ			log E
0,2	3395			− 0,70
0,3	3097			− 0,52
0,4	3025			− 0,40
0,5	2975			− 0,30
0,6	2937			− 0,22
0,7	2904	2468	2354	− 0,16
0,8	2876	2548	2307	− 0,10
0,9	2811	2620	2288	− 0,05
1,0			2278	0,00
1,1			2269	0,04
1,2			2260	0,08
1,3			2250	0,11
1,4			2235	0,15
1,5			2227	0,18

[1] Vorgelegt der Polnischen Akademie der Wissenschaften. — [2] Diese Zeitschr. **250**, 385, 1932; **261**, 393, 1933; **262**, 248, 1933; **265**, 50, 1933. — [3] Bull. de l'Acad. Pol. des Sciences **1937**, S. 140.

Mit Hilfe dieser Werte wurde die molare Extinktionskurve 1 (Abb. 1) erhalten. Sie hat selektiven Charakter und zeigt ein Maximum bei 2725 Å, $\log E = 0{,}0$, und ein Minimum bei 2410 Å, $\log E = -0{,}2$.

Das Originalpräparat wurde zur weiteren Reinigung unter Zuhilfenahme eines *Soxhlet*-Apparates in Methanol gelöst: aus der Lösung schieden sich Kristalle aus. Diese wurden in einer möglichst kleinen Menge Wasser gelöst und die Lösung wurde dann mit einer größeren Menge Methanol versetzt. Die erhaltenen Kristalle (Schmelzpunkt 164 bis 165° C) wurden in wässeriger Lösung optisch untersucht:

$c = 0{,}5$ Mol, $d = 2$ cm.

a	λ			$\log E$
0,1	3208			− 1,30
0,2	3021	2478	2375	− 1,00
0,3	2824	2650	2301	− 0,82
0,4			2270	− 0,70
0,5			2247	− 0,60
0,6			2225	− 0,52
0,7			2210	− 0,46
0,8			2196	− 0,40
0,9			2185	− 0,35
1,0			2174	− 0,30
1,1			2165	− 0,26
1,2			2157	− 0,22

Diese Werte führten zur molekularen Extinktionskurve 2 (Abb. 1). Sie zeigt ein Maximum bei 2750 Å, $\log E = -0{,}78$, und ein Minimum bei 2420 Å, $\log E = -1{,}04$.

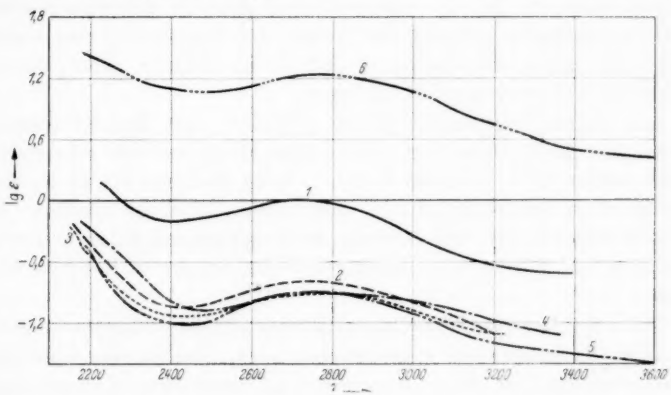


Abb. 1.

Nach weiterem dreimaligen Umkristallisieren aus Mischungen von Methanol und Wasser wurde das Präparat mit folgendem Resultat untersucht:

$c = 1$ Mol, $d = 2$ cm. $c = 0{,}5$ Mol, $d = 4$ cm.
(Mittelwerte.)

a	λ			$\log E$
0,1	3229			— 1,30
0,2	2929	2604	2323	— 1,00
0,3			2257	— 0,82
0,4			2230	— 0,70
0,5			2211	— 0,60
0,6			2199	— 0,52
0,7			2188	— 0,46
0,8			2175	— 0,40
0,9			2167	— 0,35
1,0			2158	— 0,30
1,1			2146	— 0,26

Der Schmelzpunkt blieb unverändert (164,5°). Den angegebenen Werten entspricht Kurve 3, welche ein Maximum bei 2800 Å, $\log E = -0{,}9$, und ein Minimum bei 2425 Å, $\log E = -1{,}14$, aufweist.

Ein zweites Sorbosepräparat derselben Herkunft, viermal aus Mischungen von Wasser und Methanol umkristallisiert (Schmelzpunkt 164°) ergab Kurve 4 (Abb. 1). Sie zeigt ein Maximum bei 2800 Å, $\log E = -0{,}9$, und ein Minimum bei 2490 Å, $\log E = -1{,}08$. Dasselbe Präparat, sechsmal umkristallisiert, zeigte denselben Schmelzpunkt und die Extinktionswerte der Kurve 5. Sie zeigt ein Maximum bei 2780 Å, $\log E = -0{,}9$, und ein Minimum bei 2420 Å, $\log E = -1{,}2$.

Kurve 6 (Abb. 1) entspricht einer Beimengung, welche aus den verschiedenen Mutterlaugen isoliert wurde. Sie wurde unter der Annahme konstruiert, daß der isolierte Körper dasselbe Molekulargewicht besitzt wie Sorbose, während der Verlauf der Kurven 2, 3 und 4 sehr ähnlich ist, zeigen die Kurven 1 und 6 viel stärkere Absorptionen, welche auf Verunreinigungen hinweisen.

Aus obigen Ergebnissen ist zu schließen, daß Sorbose selektiv kurzwelliges Licht absorbiert, wobei das Maximum der Absorption in das Gebiet 2780 bis 2800 Å fällt. Ganz ähnliche Werte wurden beim Studium der möglichst rein dargestellten Lävulose erhalten. Es erscheint daher sicher, daß Ketosen, im Gegensatz zu Aldosen, wenigstens zum Teil in wässeriger Lösung in Form von freien Ketonen vorliegen.

Unter den Derivaten der Glucose ist eines, welchem übereinstimmend die Aldehydketonstruktur zugeschrieben wird, nämlich das Glucoson. Übereinstimmend mit dieser Annahme zeigt dieser Körper ausgeprägte selektive Absorption des kurzwelligen Lichtes.

Das benötigte Glucoson haben wir nach der Vorschrift von *E. Fischer* dargestellt, allerdings wurde es nicht kristallisiert erhalten. Das Präparat war nahezu farblos und wurde bis zum konstanten Gewicht im Vakuum getrocknet.

$c = 0{,}1$ Mol, $d = 0{,}5$ cm. $c = 0{,}05$ Mol, $d = 1$ cm.
(Mittelwerte.)

α	λ			log E
0,1	3920			0,30
0,2	3595			0,60
0,3	3445			0,78
0,4	3382			0,90
0,5	3325			1,00
0,6	3297	2565	2452	1,09
0,7	3260	2623	2411	1,15
0,8	3225	2666	2383	1,20
0,9	3197	2687	2364	1,25
1,0	3166	2708	2345	1,30
1,1	3150	2732	2331	1,34
1,2	3118	2765	2321	1,38
1,3	3092	2800	2309	1,41
1,4	3064	2835	2297	1,45
1,5	3034	2971	2286	1,48
1,6	3007	2916	2276	1,50
1,7			2267	1,53
1,8			2258	1,56

Den obigen Werten entspricht die Kurve in Abb. 2. Sie zeigt ein Maximum bei 2975 Å, log $E = 1.52$, und ein Minimum bei 2510 Å, log $E = 1{,}04$.

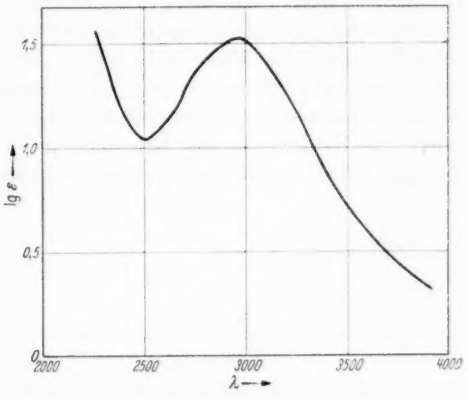


Abb. 2.

Zur Kenntnis der Azine.

Von

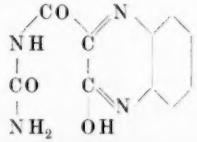
Wł. Bednarczyk und **L. Marchlewski.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Laboratorium der Jagiell. Universität.)

(Eingegangen am 12. November 1938.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Durch die Aufklärung des Vitamins B_2 haben die Azine besondere Bedeutung erlangt. Als Azinbildner verdient vor allem das Alloxan Beachtung, es reagiert leicht mit aromatischen O-Diaminen, wobei zwei Sauerstoffatome des ersteren in Reaktion treten. Um das Azin glatt zu erhalten, müssen jedoch die Versuchsbedingungen entsprechend gewählt werden. Kombiniert man Alloxan mit o-Phenylendiamin in saurer Lösung bzw. mit dem Chlorhydrat des Diamins, so entsteht nahezu quantitativ Alloxazin. Bei Ausschluß von Mineralsäuren verläuft die Kondensation anders, es bildet sich eine Ureidsäure. Wird z. B. 1,42 g Alloxan in 25 ccm Wasser gelöst und mit einer äquimolekularen Menge von o-Phenylendiamin-Chlorhydrat versetzt, zu welcher vorher ein großer Überschuß von Natriumacetat zugesetzt war, und die Mischung 2 Stunden lang auf dem Wasserbade erhitzt, so erhält man nach dem Abkühlen eine gelbe Fällung, welche in siedendem Wasser vollständig löslich ist und hieraus in schönen gelben Nadeln auskristallisiert. Schmelzpunkt 238 bis 239° C. Der Körper zeigt saure Eigenschaften, löst sich sehr leicht in Alkalien und ist zweifellos ein nach der Formel



gebautes Säureureid, analog den Ureiden, welche *Hinsberg* (1) erhalten hat. Die Entstehung eines Ureids unter diesen Umständen kann auf zweierlei Wegen erklärt werden. Zunächst könnte man annehmen, daß Alloxan je nach den Umständen entweder als heterocyclischer oder offener Körper gebaut ist, wobei letztere Konstitution in neutraler wässeriger Lösung, erstere in saurer Lösung vorliegen würde. Die Entscheidung konnte durch die spektrographische Untersuchung neutraler und saurer Lösungen getroffen werden. Wir untersuchten das

Absorptionsvermögen einer neutralen und einer 5% HCl enthaltenden Lösung mit folgendem Ergebnis:

Konzentration 0,002 Mol, Schichtdicke $d = 0{,}5$ cm, neutrale Lösung.

α	λ	ε	log ε
0,6	2389	600	2,77
0,7	2377	700	2.84
0,8	2364	800	2,90
0,9	2360	900	2,95
1,0	2353	1000	3,00
1,1	2351	1100	3,04
1,2	2348	1200	3,08
1,3	2345	1300	3,11
1,4	2339	1400	3,15
1,5	2337	1500	3,18

Konzentration 0,002 Mol, $d = 2$ cm.

α	λ	ε	log ε
0,3	2530	75	1,87
0,4	2512	100	2,00
0,5	2492	125	2,10
0,6	2485	150	2,18
0,7	2474	175	2,24
0,8	2467	200	2,30
0,9	2458	225	2,35
1,0	2455	250	2,40
1,1	2448	275	2,44
1,2	2445	300	2,48
1,3	2439	325	2,51
1,4	2434	350	2,54
1,5	2424	375	2,57

Konzentration 0,02 Mol, $d = 0{,}5$ cm.

α	λ	ε	log ε
0,4	2797	40	1,60
0,5	2724	50	1,70
0,6	2687	60	1,78
0,7	2538	70	1,84
0,8	2529	80	1,90
0,9	2520	90	1,95
1,0	2512	100	2,00
1,1	2507	110	2,04
1,2	2503	120	2,08
1,3	2498	130	2,11
1,4	2496	140	2,15
1,5	2493	150	2,18

Konzentration 0,02 Mol, $d = 4$ cm.

α	λ	ε	log ε
0,1	3046	1,25	0,10
0,2	2980	2,50	0,40
0,3	2950	3,75	0,57
0,4	2930	5,00	0,70
0,5	2927	6,25	0,80
0,6	2915	7,50	0,87
0,7	2909	8,75	0,90
0,8	2902	10,00	1,00
0,9	2895	11,25	1,05
1,0	2890	12,50	1,10
1,1	2885	13,75	1,14
1,2	2878	15,00	1,18
1,3	2876	16,25	1,21
1,4	2872	17,50	1,24
1,5	2865	18,75	1,27

Aus diesen Werten ergibt sich die molare Extinktionskurve, welche in Abb. 1, Kurve 1, wiedergegeben ist.

Ganz analoge Werte wurden für Lösungen des Alloxans erhalten, welche 5% HCl enthielten. Die entsprechende Kurve 2 fällt mit der Kurve 1 nahezu vollständig zusammen.

Aus diesen Befunden ist zu schließen, daß Alloxan in neutraler oder saurer Lösung denselben und zwar wahrscheinlich den heterocyclischen Bau besitzt und daß die Bildung des Säureureids in zwei Stadien verläuft. Dabei reagiert zunächst nur eine Aminogruppe des Diamins, darauf erfolgt die Sprengung des Alloxanringes unter Auf-

nahme von Wasser und schließlich tritt die zweite Amingruppe in Aktion unter Bildung des Azinringes. Die Lichtabsorption dieses

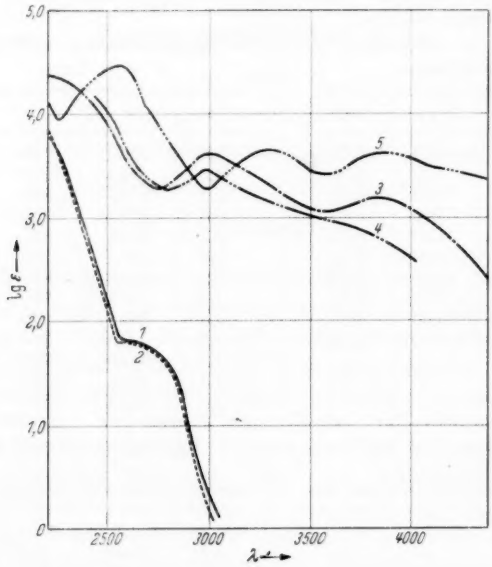


Abb. 1.

Ureids wurde in wässeriger und alkalischer Lösung mit folgenden Ergebnissen untersucht:

Wässerige Lösungen.

Tafel I.
Konzentration $c = 0{,}0005$ Mol, $d = 2$ cm;
Konzentration $c = 0{,}00025$ Mol, $d = 4$ cm
(Mittelwerte).

α	λ			ε	log ε
0,1	4482			100	2,00
0,2	4417			200	2,30
0,3	4362			300	2,48
0,4	4310			400	2,60
0,5	4265			500	2,70
0,6	4227			600	2,78
0,7	4185			700	2,84
0,8	4142			800	2,90
0,9	4107			900	2,95
1,0	4085			1000	3,00
1,1	4050			1100	3,04
1,2	3995	3640	3510	1200	3,08
1,3	3970	3707	3470	1300	3,11
1,4	3920	3745	3445	1400	3,15
1,5			3415	1500	3,18

Tafel II.
Konzentration $c = 0{,}0005$ Mol, $d = 0{,}5$ cm;
Konzentration $c = 0{,}00025$ Mol, $d = 1$ cm
(Mittelwerte).

α	λ			ε	log ε
0,4	3385			1600	3,20
0,5	3317	2781	2730	2000	3,30
0,6	3254	2842	2685	2400	3,38
0,7	3190	2873	2632	2800	3,45
0,8	3137	2911	2612	3200	3,50
0,9	3096	2941	2596	3600	3,56
1,0	3054	2988	2590	4000	3,60
1,1			2581	4400	3,64
1,2			2569	4800	3,68
1,3			2546	5200	3,72
1,4			2528	5600	3,75
1,5			2511	6000	3,78

Tafel III.

Konzentration $c = 0{,}000\,125$ Mol, $d = 0{,}5$ cm.

α	λ	ε	$\log \varepsilon$	α	λ	ε	$\log \varepsilon$
0,7	2436	11 200	4,05	1,2	2312	19 200	4,28
0,8	2408	12 800	4,11	1,3	2296	20 800	4,32
0,9	2383	14 400	4,16	1,4	2265	22 400	4,35
1,0	2353	16 000	4,20	1,5	2213	24 000	4,38
1,1	2335	17 600	4,25				

Die mit Hilfe dieser Werte erhaltene molare Extinktionskurve 3 (Abb. 1) zeigt zwei Maxima und zwei Minima:

Band I. Maximum bei 3010 Å, $\log \varepsilon = 3{,}62$
„ II. „ „ 3875 Å, $\log \varepsilon = 3{,}20$
„ I. Minimum „ 2760 Å, $\log \varepsilon = 3{,}28$
„ II. „ „ 3570 Å, $\log \varepsilon = 3{,}06$

Die alkalische Lösung des Ureids zeigt ein analoges Spektrum (Kurve 4, Abb. 1), jedoch sind nur ein Maximum und ein Minimum deutlich wahrzunehmen.

Zum Vergleich geben wir noch das Spektrum des Alloxazins wieder, dessen molare Extinktionskurve der Kurve 5, Abb. 1, entspricht. Sie zeigt drei Maxima und drei Minima:

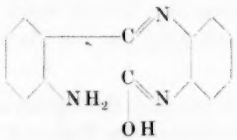
Band I. Maximum bei 2545 Å, $\log \varepsilon = 4{,}63$
„ II. „ „ 3310 Å, $\log \varepsilon = 3{,}66$
„ III. „ „ 3880 Å, $\log \varepsilon = 3{,}59$
„ I. Minimum „ 2255 Å, $\log \varepsilon = 3{,}96$
„ II. „ „ 2990 Å, $\log \varepsilon = 3{,}29$
„ III. „ „ 3480 Å, $\log \varepsilon = 3{,}41$

Die obigen Werte beziehen sich auf eine Alloxazinlösung in n/100 NaOH, sie stimmen mit den Angaben von *Kuhn* (2) und Mitarbeitern überein.

Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß auch andere Azine künftig biologisches Interesse beanspruchen werden. Als Azinbildner werden voraussichtlich vor allem Diketone in Frage kommen, und besonders solche, welche von Substanzen abstammen, die schon jetzt als Bestandteile von Pflanzen bekannt sind. Zu diesen müssen Abkömmlinge des Indols gerechnet werden. Indoxyl ist bekanntlich ein Bestandteil des pflanzlichen Indikans, in naher Beziehung zu demselben steht Isatin, welches bekanntlich (3) mit aromatischen Diaminen Azine liefert. Wir haben deswegen das optische Verhalten dieser Gruppe von Körpern näher untersucht. Das Isatin reagiert bekanntlich tautomer: In alkoholischer Lösung liegt es in Form eines zwei Carbonylgruppen enthaltenden Körpers vor, eine Annahme, die durch das optische Studium des Isatins bewiesen wird. Entgegen den Ver-

suchen von *Morton* und *Rogers* (4) konnten *Dąbrowski* und *Marchlewski* (5) die Ergebnisse von *Hartley* in vollem Maße bestätigen, indem sie neuerdings zeigen konnten, daß der Stickstoffäther grundsätzlich dasselbe Spektrum besitzt wie Isatin, während die Lichtabsorption des Sauerstoffäthers ganz anders verläuft. In wässeriger Lösung des Isatins liegen die Verhältnisse insofern anders, als hier noch mit freier Isatinsäure zu rechnen ist. Kondensiert man daher Isatin in wässeriger Lösung mit o-Phenylendiamin, so erhält man neben dem Indophenazin von der Formel

kleine Mengen von o-Aminophenyl-Hydroxychinoxalin von der Formel:



Das Indophenazin wurde in der früher angegebenen Weise hergestellt und gereinigt, es zeigte einen etwas höheren Schmelzpunkt (295 bis 297° C) als früher gefunden wurde. Es kristallisiert entweder in langen, gelben Nadeln oder kurzen, breiten Prismen. Das optische Absorptionsvermögen wurde für alkoholische Lösungen bestimmt. Gefunden wurde:

Tafel I.

Konzentration $c = 0{,}0001$ Mol, $d = 2$ cm, und Konzentration $c = 0{,}00005$ Mol, $d = 4$ cm (Mittelwerte).

α	λ			ε	$\log \varepsilon$
0,0	4565				
0,1	4442			500	2,70
0,2	4372			1000	3,00
0,3	4280			1500	3,18
0,4	4210			2000	3,30
0,5	4150			2500	3,40
0,6	4070	3870	3757	3000	3,48
0,7			3710	3500	3,54
0,8			3692	4000	3,60
0,9			3685	4500	3,65
1,0			3677	5000	3,70
1,1			3672	5500	3,74
1,2			3667	6000	3,78
1,3			3663	6500	3,81
1,4			3659	7000	3,84
1,5			3655	7500	3,87

Tafel II. Konzentration $c = 0{,}0001$ Mol, $d = 0{,}5$ cm, und Konzentration $c = 0{,}00005$ Mol, $d = 1$ cm (Mittelwerte).

α	λ			ε	$\log \varepsilon$	α	λ			ε	$\log \varepsilon$
0,0		2991	2865			0,4	3636	3317		8 000	3,90
0,1		3105	2814	2000	3,30	0,5	3617	3385		10 000	4,00
0,2	3682	3191	2792	4000	3,60	0,6	3600	3484		12 000	4,08
0,3	3660	3252		6000	3,78	0,7	3587	3520		14 000	4,15

Tafel III. Konzentration $c = 0{,}00002$ Mol, $d = 1$ cm, und Konzentration $c = 0{,}00001$ Mol, $d = 2$ cm (Mittelwerte).

α	λ			ε	$\log \varepsilon$
0,0	2805				
0,1	2785	2485	2386	5 000	3,70
0,2	2765	2525	2287	10 000	4,00
0,3	2754	2560	2249	15 000	4,18
0,4	2742	2584	2204	20 000	4,30
0,5	2732	2605		25 000	4,40
0,6	2723	2626		30 000	4,48
0,7	2707	2661		35 000	4,54

Mit Hilfe dieser Werte wurde die molare Extinktionskurve 2 (Abb. 2) erhalten. Sie zeigt drei Maxima und drei Minima:

I. Maximum	2685 Å,	$\log \varepsilon = 4{,}55$	I. Minimum	2440 Å,	$\log \varepsilon = 3{,}66$
II. „	3570 Å,	$\log \varepsilon = 4{,}18$	II. „	2950 Å,	$\log \varepsilon = 3{,}17$
III. „	3970 Å,	$\log \varepsilon = 3{,}53$	III. „	3810 Å,	$\log \varepsilon = 3{,}45$

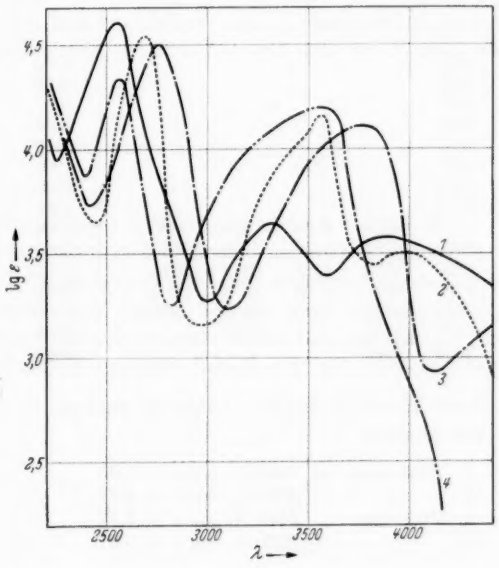


Abb. 2.

Zum Vergleich mit dem Spektrum des Indophenazins geben wir das Spektrum des o-Aminophenyl-Hydroxychinoxalins, welches dem des obenerwähnten Säureureids ähnlich ist. Dieses Hydroxychinoxalinderivat bildet sich, wie erwähnt, neben dem Indophenazin beim Kondensieren einer wässerigen Isatinlösung mit dem Diamin oder in quantitativer Ausbeute beim Verseifen des Kondensationsproduktes von Acetylisatin mit o-Phenylendiamin. Lösungen von Acetylisatin enthalten nach dem optischen Verhalten solcher Lösungen freie Acetylisatinsäure. o-Aminophenyl-Hydroxychinoxalin löst sich leicht in wässerigen Alkalien, kristallisiert in schönen gelben Nadeln und schmilzt bei 258 bis 260° C. Optisch wurden alkoholische Lösungen untersucht.

Tafel I.

Konzentration $c = 0{,}0001$ Mol, $d = 0{,}5$ cm, und Konzentration $c = 0{,}00005$ Mol, $d = 1$ cm (Mittelwerte).

α	λ	ε	$\log \varepsilon$	α	λ	ε	$\log \varepsilon$
0,4	2535	8 000	3,90	0,8	2353	16 000	4,20
0,5	2481	10 000	4,00	0,9	2314	18 000	4,25
0,6	2436	12 000	4,08	1,0	2273	20 000	4,30
0,7	2392	14 000	4,15	1,1	2259	22 000	4,34

Tafel II.

Konzentration $c = 0{,}0001$ Mol, $d = 2$ cm, und Konzentration $c = 0{,}00005$ Mol, $d = 4$ cm (Mittelwerte).

α	λ					ε	$\log \varepsilon$
0,2	4932					1000	3,00
0,3	4787					1500	3,18
0,4	4687					2000	3,30
0,5	4600					2500	3,40
0,6	4537					3000	3,48
0,7	4475					3500	3,54
0,8	4412					4000	3,60
0,9	4312					4500	3,65
1,0	4207	3253	3190	2727	2663	5000	3,70
1,1	3985	3297	3156	2778	2635	5500	3,74
1,2	3860	3352	3128	2823	2615	6000	3,78
1,3	3780	3398	3100	2876	2602	6500	3,81
1,4	3745	3439	3065	2933	2593	7000	3,84
1,5	3727	3465		2998		7500	3,87
1,6	3702	3530				8000	3,90

Mit Hilfe dieser Werte ist Kurve 1 (Abb. 3) erhalten, sie zeigt zwei Maxima und zwei Minima:

I. Maximum bei 2560 Å, $\log \varepsilon = 4{,}35$
II. „ „ 3550 Å, $\log \varepsilon = 4{,}22$
I. Minimum „ 2390 Å, $\log \varepsilon = 3{,}89$
II. „ „ 2820 Å, $\log \varepsilon = 3{,}27$

Zum Vergleich geben wir in derselben Abbildung das Spektrum des Säureureids Kurve 2. Wie ersichtlich, sind die Lichtabsorptionen beider Körper ziemlich ähnlich, aber vom Indophenazin oder Alloxazin abweichend. Hervorzuheben ist aber, daß, sobald an dem Azinring von

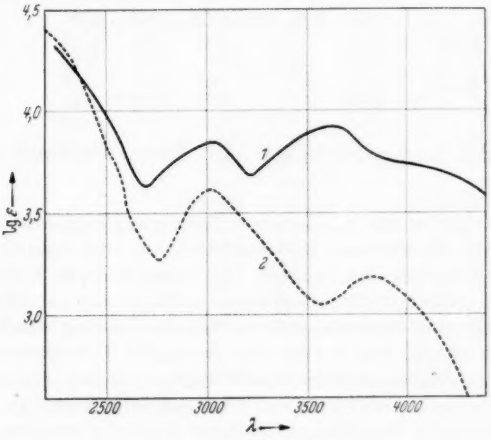
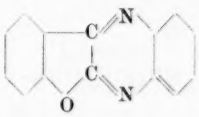


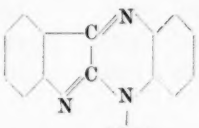
Abb. 3.

neuem ein Ringschluß erfolgt, die Spektren wieder ähnlich werden. Diese Tatsache illustriert das Spektrum des Kumarophenazins, welches der eine von uns vor Jahren mit *J. Sosnowski* (6) aus dem o-Amino-Hydroxychinoxalin erhalten hat und dem die Formel entspricht:

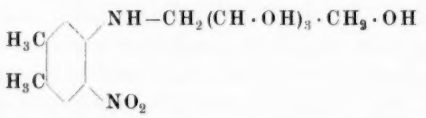


Das Spektrum dieses Körpers zeigt Kurve 4 (Abb. 2).

Endlich sei auf einen Körper hingewiesen, welcher dem Vitamin B_2 konstitutionell nahesteht und als Abkömmling des Indols angesehen werden kann. Vor Jahren hat der eine von uns gezeigt, daß Isatin mit Alkyl-o-Diaminen reagiert unter Bildung von Alkyläthern, welche isomer mit Alkylierungsprodukten des Indophenazins sind, sie besitzen den Bau



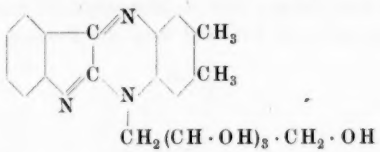
und bei ihrer Bildung reagiert das Isatin in Form der Oxycarbonylform. Ähnliches konnte erwartet werden bei der Wiederholung der bekannten Vitaminsynthese aus Alloxan und Ribityl-o-xylylendiamin. Wir realisierten diesen Gedanken unter Anwendung des Nitrokörpers:



welchen wir der Liebenswürdigkeit der Firma *Hoffmann-La-Roche* verdanken.

Der Nitrokörper wurde in essigsaurer Lösung mit Zinkstaub reduziert, der Überschuß von Zn abfiltriert und das Filtrat mit einer äquimolekularen Menge Isatin in Eisessig gelöst versetzt. Das Gemisch wurde 3 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt, stark mit Wasser verdünnt und mit Natronlauge neutralisiert. Es wurde eine rote, gallertartige Abscheidung erhalten, die in $^1/_{20}$ n HCl gelöst wurde. Durch Filtration der gelben Lösungen wurde eine braune Verunreinigung abgetrennt, das Filtrat von neuem alkalisiert und die rote Substanz nach dem Trocknen zu kristallisieren versucht. Bis jetzt sind jedoch alle unsere Bemühungen in dieser Richtung erfolglos gewesen. Trotzdem war der Stickstoffgehalt der bei 105° C getrockneten Substanz der theoretisch erwartete:

11,02 % N berechnet, 10,90 % N gefunden[1] für:



Das Spektrum des Körpers wurde in alkoholischer Lösung untersucht.

Tafel I.

Konzentration $c = 0{,}0001$ Mol, $d = 2$ cm.

a	λ		ε	$\log \varepsilon$
0,2	4200	4040	1000	3,00
0,3	4445	4025	1500	3,18
0,4	4650	3995	2000	3,30

[1] Mittelwerte von 10,95, 10,79 und 10,96 % N.

Tafel II.

Konzentration $c = 0{,}0001$ Mol, $d = 0{,}5$ cm; Konzentration $c = 0{,}00005$ Mol, $d = 1$ cm (Mittelwerte).

α	λ					ε	$\log \varepsilon$
0,1	4000	3163	3027			2 000	3,30
0,2	3972	3297	2961			4 000	3,60
0,3	3937	3386	2924	2440	2374	6 000	3,78
0,4	3922	3455	2907	2503	2335	8 000	3,90
0,5	3892	3535	2897	2544	2305	10 000	4,00
0,6	3852	3607	2885	2567	2286	12 000	4,08
0,7			2880	2595		14 000	4,15
0,8			2867	2615		16 000	4,20
0,9			2858	2629		18 000	4,25
1,0			2850	2648		20 000	4,30
1,1			2842	2662		22 000	4,34
1,2			2832	2678		24 000	4,38
1,3			2817	2695		26 000	4,41
1,4			2801	2711		28 000	4,45
1,5			2781	2729		30 000	4,48
1,6			2772	2735		32 000	4,50

Kurve 3 (Abb. 2)[1] entspricht den obigen Werten. Sie zeigt zwei Maxima und drei Minima:

I. Maximum bei 2760 Å, $\log \varepsilon = 4{,}52$
II. „ „ 3760 Å, $\log \varepsilon = 4{,}14$
I. Minimum „ 2410 Å, $\log \varepsilon = 3{,}75$
II. „ „ 3100 Å, $\log \varepsilon = 3{,}24$
III. „ „ 4120 Å, $\log \varepsilon = 2{,}94$

Die Untersuchung der physiologischen Eigenschaften dieses Körpers steht noch aus.

Literatur.

1) Ber. **18**, 1228, 1885. — 2) Ber. **67**, 898, 1934. — 3) Ber. **32**, 1869, 1898; **34**, 1113, 1901. — 4) J. Chem. Soc. London **127**, 2698, 1925. — 5) Bull. de L'Acad. Polon. des Sciences et Lettres **1933**, S. 381. — 6) Ebenda **1901**, S. 1108.

[1] Kurve 1, Abb. 2 entspricht dem Alloxazin.

Absorption kurzwelligen Lichtes durch Indirubin und Indigotin.

Von

J. Cholewiński und L. Marchlewski.

(Aus dem medizinisch-chemischen Laboratorium der Jagiellonischen Universität in Kraków.)

(Eingegangen am 12. November 1938.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Die Absorption kurzwelligen Lichtes der beiden genannten Farbstoffe wurde bis jetzt nur qualitativ verfolgt. Wir unternahmen es, den Verlauf der Absorption quantitativ zu verfolgen unter Anwendung der Methode von *Spekker-Hilger*. Als Lichtquelle diente ein Funken von hoher Spannung zwischen Stahl-Wolframelektroden.

Indirubin.

Wir benutzten ein synthetisches Präparat, welches zunächst dreimal aus Anilin umkristallisiert und dann im Hochvakuum sublimiert wurde. Für die optische Untersuchung wurden alkoholische Lösungen hergestellt. Die Herstellung von Lösungen bestimmter Konzentration macht Schwierigkeiten, da der Farbstoff sehr schwer löslich ist. Wir verwandten daher gesättigte alkoholische Lösungen, deren Konzentration durch Verdampfung bestimmt wurde und welche dann auf die gewünschte Konzentration verdünnt wurden.

Konzentration der Lösung 0,00001 Mol pro Liter.

Schichtdicke $d = 0{,}5$ cm. Schichtdicke $d = 2$ cm.

α	λ					log ε	λ				log ε
0,3			2539	2674		3,77			4060	4520	3,17
0 4	2221	2348	2483	2740		3,90			3980	4660	3,30
0,5	2191	2377	2435	2771	3001	4,00			3930	4750	3,39
0,6	2175			2804	2972	4,08			3905		3,47
0,7				2843	2945	4,14	3281	3458	3849		3,54
0,8							3239	3538	3708		3,60
0,9							3218				3,65
1,0							3186				3,69
1,1							3168				3,74
1,2							3158				3,77
1,3							3125				3,81
1,4							3110				3,84

Die mit Hilfe dieser Werte erhaltene molekulare Extinktionskurve 1 (Abb. 1) zeigt drei Maxima und vier Minima:

Maximum I bei 2415 Å, $\log \varepsilon = 4{,}04$.
„ II „ 2900 Å, $\log \varepsilon = 4{,}21$.
„ III „ 3635 Å, $\log \varepsilon = 3{,}64$.
Minimum I „ 2290 Å.
„ II „ 2609 Å.
„ III „ 3380 Å.
„ IV „ 4250 Å.

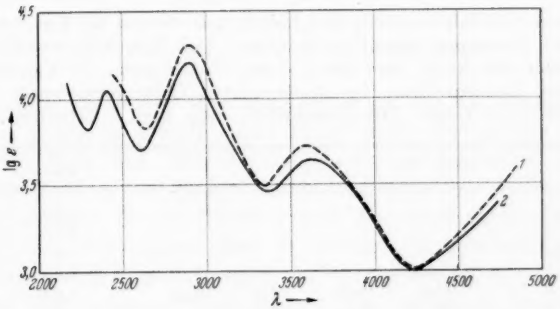


Abb. 1

Um diese Befunde zu kontrollieren, wurden noch Chloroformlösungen untersucht. In Chloroform löst sich Indirubin leichter als in Alkohol und die Herstellung von Lösungen bekannter Konzentration machte keine Schwierigkeiten. Die Lösung enthielt pro Liter 0,00001 Mol; sie wurde in zwei Schichtdicken untersucht:

Schichtdicke $d = 0{,}5$ cm.					Schichtdicke $d = 2$ cm.				
α	λ			$\log \varepsilon$	λ				$\log \varepsilon$
0,3							4070	4480	3,17
0,4	2579	2695		3,90			3980	4600	3,30
0,5	2545	2738	3087	4,00			3928	4710	3,39
0,6	2501	2769	3060	4,08			3885	4790	3,47
0,7	2430	2792	3028	4,14	3268	3412	3815	4830	3,54
0,8		2819	3002	4,20	3237	3448	3748		3,60
0,9		2856	2980	4,25	3214	3500	3701		3,65
1,0					3195				3,69
1,1					3186				3,74
1,2					3170				3,77
1,3					3149				3,81
1,4					3140				3,84
1,5					3120				3,87

Die erhaltene Extinktionskurve 2 (Abb. 1) verläuft der in alkoholischer Lösung gefundenen ganz analog, zeigt aber nur zwei Maxima

infolge der geringeren Durchlässigkeit des Chloroforms für kurzwellige Strahlen.

Maximum I bei 2895 Å, $\log \varepsilon = 4{,}32$.
„ II „ 3600 Å, $\log \varepsilon = 3{,}23$.
Minimum I „ 2635 Å.
„ II „ 3345 Å.
„ III „ 4250 Å.

Es sei hervorgehoben, daß Indirubinlösungen dem *Beer*schen Gesetz folgen.

Indigotin.

Indigotin löst sich so wenig in Alkohol, daß wir auf die Untersuchung alkoholischer Lösungen verzichten mußten. Der Farbstoff wurde durch Kristallisation aus Anilin und dann durch Sublimation im Vakuum gereinigt. Die Konzentration der untersuchten Chloroformlösung betrug 0,0000218 Mol pro Liter. Die Schichtdicke war 4 cm. Erhalten wurde:

α	λ				$\log \varepsilon$
0,2					3,35
0,3					3,53
0,4					3,66
0,5					3,75
0,6	2591	2672	3238	3438	3,83
0,7	2572	2720	3120		3,90
0,8	2543	2742	3055		3,96
0,9		2757	3002		4,01
1,0		2762	2962		4,05
1,1		2767	2926		4,09
1,2		2776	2915		4,13
1,3		2791	2907		4,17
1,4		2710	2890		4,20

Die molare Extinktionskurve des Indigotins (Kurve in Abb. 2) zeigt zwei Maxima, von denen eins verschwommen erscheint:

Maximum I: 2885 Å, $\log \varepsilon = 4{,}25$.
„ II: 3300 bis 3400 Å.
Minimum: 2630 Å.

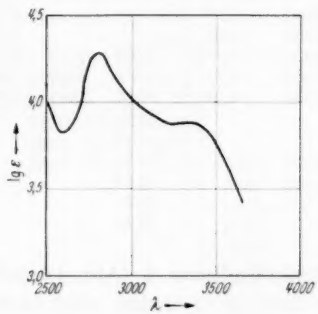


Abb. 2.

Beiträge zur biologischen Zellsubstanz-Synthese der Hefe*.

III. Mitteilung:

Hefezüchtung in einfachen Kohlenstoffverbindungen.

Von

Hermann Fink und **Jos. Krebs.**

(Aus dem Institut für Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 15. November 1938.)

In unseren letzten Mitteilungen[1] ist die für die biologische Zellsubstanz-Synthese grundlegende Frage nach der praktisch höchstmöglichen Hefe- bzw. Eiweißausbeute aus einer gegebenen Menge vergärbaren Zuckers als einziger Kohlenstoffquelle beantwortet worden. Durch intensive Sauerstoffzufuhr und Sauerstoffausnutzung, wie sie bei der von uns angewandten Apparatur[2] für standardisierte Hefezüchtungen nach dem Lüftungsverfahren gegeben ist, sowie durch Einhaltung der sonstigen Bedingungen für optimales Hefewachstum, konnten aus 100 g Glucose und anorganischen Nährsalzen bis zu 210 g Torulahefe mit 25% Trockensubstanz, diese mit 59,4% Eiweiß, erhalten werden. Dabei traten nur noch Spuren von Alkohol (0,02 g) auf. Die Umsteuerung von der alkoholischen Gärung auf Zellsubstanz-Synthese war also eine praktisch vollständige. Die Energieausbeute bei dieser Umwandlung von Kohlenhydraten in eiweißreiche Hefe ist mit rund 65% von uns ermittelt worden, wobei einerseits der Energiegehalt der Nährstoffe und andererseits der der zugewachsenen Hefe bestimmt wurde.

Wichtig war die weitere Feststellung, daß Wuchsstoffe verschiedener Art, jeder für sich oder in Kombination angewandt, nach unseren bisherigen Versuchen keine Wirkung im Hinblick auf eine Steigerung der Ausbeute hatten. Im Gegensatz zu Kulturhefen ist also Torula utilis von der Zufuhr von Wuchsstoffen völlig unabhängig. Sie baut aus Zucker und sonst nur anorganischen Nährsalzen mit bester Ausbeute ihre Körpersubstanz und damit auch ihre Wuchsstoffe auf. Es könnte nur noch sein, daß gewisse Wirkstoffe die Geschwindigkeit der Zellsubstanz-Synthese beeinflussen. Versuche in dieser Richtung werden zur Zeit von uns durchgeführt.

* D 11.

[1] Diese Zeitschr. **299**, 1, 1938; Angew. Chem. **51**, 475, 1938. — [2] Diese Zeitschr. **299**, 28, 1938.

Die vorliegende Mitteilung stellt einen experimentellen Beitrag zur Frage des Reaktionsmechanismus der biologischen Zellsubstanz-Synthese und speziell Eiweiß-Synthese dar. Es sollten, mit anderen Worten, der Weg bzw. die Zwischenstufen aufgeklärt werden, über die diese Synthese verläuft, wenn Hefe aus Kohlenhydraten und anorganischen Nährsalzen neue Zellsubstanz und damit auch neues Eiweiß aufbaut. Die mannigfachen Möglichkeiten, die hier auf Grund des Schrifttums denkbar sind, sollen erst im Zusammenhang mit unserer eigenen Arbeitshypothese und der Gesamtdiskussion unserer Versuchsergebnisse in einer späteren Veröffentlichung besprochen werden.

Nachdem also die zahlreichen Standardversuche mit reinen Zuckerlösungen praktisch gleich hohe Ausbeuten und Resultate ergeben hatten, die auch durch die Anwendung von bioshaltigen Präparaten nicht mehr weiter verbessert werden konnten, lag es nahe, auch andere Kohlenstoffquellen zunächst auf ihre Verwertbarkeit für den Hefezellaufbau zu untersuchen und schließlich die bei der Züchtung unter Standardbedingungen zu erzielenden Ausbeuten festzulegen und zu denen des Zuckers in Beziehung zu bringen. Als solche Kohlenstoffquellen kamen in erster Linie Verbindungen in Betracht, die zum Zucker und seinen Aufbauprodukten in enger Beziehung stehen, wie Brenztraubensäure, Milchsäure, Acetaldehyd, Äthylalkohol, Essigsäure, aber auch Glycerin, Methylalkohol, Ameisensäure, Formaldehyd u. a. m. Es ist natürlich noch nicht gesagt, daß die Stoffe, welche von der Hefe aufgenommen werden und einen deutlichen Zuwachs ergeben, schon ohne weiteres als Zwischenstufen für den Aufbau der verschiedenartig zusammengesetzten Zellsubstanz anzusprechen sind, da diese vor ihrer Assimilation durch die Hefe und vor ihrem endgültigen Einbau in die Hefezellsubstanz eine beträchtliche Umwandlung erfahren können. Andererseits ist daran zu denken, daß Stoffe, welche kaum oder nur in geringem Maße von der Hefe aufgenommen werden, als nascierende Zwischenprodukte viel reaktionsfähiger sein können und in dieser Form von der Hefe verarbeitet werden können. Immerhin sind die folgenden Versuchsergebnisse geeignet, einen gewissen Einblick in den Chemismus zu ermöglichen und zur ersten Orientierung zu dienen.

A. Qualitative Versuche.

Die Versuche wurden zunächst in kleinen Mengen in der für die Heranzüchtung der Aussaathefe verwendeten Gärapparatur durchgeführt. Die Züchtungsbedingungen waren hierbei denen der Standardversuche bei Zucker angepaßt. Die verwendete Aussaathefe war in „Bergius"-Holzzuckerlösungen hergeführt und somit noch nicht an das neue Nährmedium angepaßt. *Bei diesen Züchtungen im kleinen Maßstab*

kamen zur Anwendung: Milchsäure, mit und ohne Zuckerzusatz, Brenztraubensäure, Acetaldehyd, mit und ohne Zuckerzusatz, Äthylalkohol, Essigsäure, Glycerin, Äthylacetal, Äthylenglykol, Aceton, Methylalkohol, Formaldehyd, mit und ohne Zuckerzusatz, Formose, welche durch Kondensation des Formaldehyds hergestellt war, *und Ameisensäure*. Es wurden hierbei der Zuwachs an Hefetrockensubstanz und Eiweiß, vereinzelt auch die Aschezunahme, bestimmt. Dagegen wurden bei diesen Versuchen noch nicht die Kohlensäure und der Rest der Kohlenstoffbasis in der vergorenen Flüssigkeit ermittelt. Die Ausbeuten sind demnach auf die gesamte angewandte Menge der Kohlenstoffquelle bezogen.

Die Ergebnisse der Versuche sind in *Tabelle I* zusammengestellt. Es sind angeführt:

In Spalte 1 und 25 die Nummer des Versuchs.
„ „ 2—4 die Art der angewandten Kohlenstoffquelle, die Menge und ihre Konzentration in der Nährlösung.
„ „ 5 die angewandte Stickstoffmenge, welche zu 100% aus anorganischem Stickstoff bestand.
„ „ 6—12 Trockensubstanz, Stickstoff, Eiweiß und Asche der Aussaathefe in % bzw. g.
„ „ 13—19 Trockensubstanz, Stickstoff, Eiweiß und Asche der Erntehefe in % bzw. g.
„ „ 20—24 die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz, Eiweiß und organischen Stoffen, bezogen auf 100 g der angewandten Kohlenstoffquelle bzw. auf 100 g des angewandten Kohlenstoffs.

Zunächst wurde eine 1%ige *Milchsäurelösung* verwendet, und zwar bei Versuch 34, 35 und 36 als alleinige Kohlenstoffquelle und bei Versuch 37 zusammen mit Glucose.

Es kam Milchsäure, 1,21, DAB. 6, zur Anwendung, welche von der Firma *Schering* bezogen wurde. Zwecks Spaltung des inneren Anhydrids wurde die 1%ige Milchsäurelösung 12 Stunden im siedenden Wasserbad erwärmt. Die genaue Bestimmung der Milchsäuremenge in der Nährlösung erfolgte durch Titration mit n/10 NaOH.

Bei den Versuchen 34, 35 und 36 wurde die gesamte Phosphatmenge als primäres Kaliumphosphat und der Stickstoff als Ammoniak zugegeben. Für die Berechnung der Nährsalze wurde eine aus der gleichen Zuckermenge entsprechende Ausbeute zugrunde gelegt.

Die Züchtungen mit Milchsäure als alleiniger Kohlenstoffquelle ergaben nur einen geringen Zuwachs. Die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz, bezogen auf 100 g der angewandten Menge, waren gering und betrugen 7,23, 13,05 und 8,08 g. Auffallend war besonders das Ansteigen des Eiweißgehalts der Erntehefe in den beiden ersten Versuchen, wovon 72 und 59% des Zuwachses an Trockensubstanz auf Eiweiß entfällt.

Tabelle

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Nährlösung				Aussaathefe						
Versuch Nr.	Art der Kohlenstoffquelle	Angewandte Menge g	Konzentration %	Angewandte Stickstoffmenge (100 % anorganisch) g	Trockensubstanz g	Stickstoff %	Eiweiß %	Asche %	Stickstoff g	Eiweiß g	Asche g
34	Milchsäure	20,0	1	1,090	1,30	8,74	54,65	—	0,113	0,71	—
35	Milchsäure	20,0	1	2,130	2,48	9,36	58,51	—	0,232	1,45	—
36	Milchsäure	20,2	1	1,060	1,37	9,98	62,40	—	0,137	0,85	—
37	Milchsäure + Glucose	10,0 + 20,0	1	1,569	2,59	8,72	54,50	7,96	0,226	1,41	0,21
38	Brenztraubensäure	19,6	1/2	1,060	1,32	8,83	55,15	—	0,117	0,73	—
39	Acetaldehyd	26,0	1/2	2,001	4,38	8,75	54,60	8,07	0,384	2,40	0,35
40	Acetaldehyd + Glucose	17,5 + 13,0	1/2	2,001	4,38	8,75	54,60	8,07	0,384	2,40	0,35
41	Äthylalkohol	30,6	1	1,060	1,32	8,83	55,15	—	0,117	0,73	—
42	Essigsäure	20,0	0,7	0,758	2,91	8,25	51,55	—	0,239	1,50	—
43	Glycerin	41,0	1	1,930	4,56	8,71	54,45	—	0,398	2,48	—
44	Äthylacetal	25,6	1	1,201	2,68	8,61	53,80	—	0,230	1,44	—
45	Äthylenglykol	26,0	1	1,601	2,68	8,61	53,80	—	0,230	1,44	—
46	Aceton	38,0	1	0,974	2,65	7,98	49,90	—	0,212	1,32	—
47	Methylalkohol	30,0	1	1,433	2,54	8,43	52,70	8,30	0,214	1,34	0,21
48	Ameisensäure	30,0	1	2,150	2,54	8,43	52,70	8,30	0,214	1,34	0,21
49	Formaldehyd	30,0	1	1,741	2,54	8,58	53,70	8,06	0,218	1,36	0,20
50	Formaldehyd + Glucose	15,0 + 15,0	1	1,497	2,54	8,58	53,70	8,06	0,218	1,36	0,20
51	Formose	12,0 red. Zucker	1/2	0,671	1,00	8,54	53,40	—	0,085	0,53	—

* Bezogen auf die Reduktionsdifferenz.

Versuch 37 wurde mit einer Mischung von 20 g Glucose und 10 g Milchsäure ausgeführt. Menge und Zusammensetzung der Nährsalze entsprachen den früheren Versuchen mit Zuckerlösungen und wurden auf eine 30 g Zucker entsprechende Ausbeute bezogen. Der Zucker war nach Beendigung der Züchtung restlos verschwunden. Der Zuwachs an Hefetrockensubstanz betrug 13,71 g, das sind 45,80% von Zucker + Milchsäure. Wenn die Ausbeute aus Zucker allein z. B. mit 51% (das ist die mittlere Ausbeute aus früheren Versuchen mit 1%igen Zuckerlösungen) angenommen wird, beträgt sie aus der angewandten Milchsäure noch 35,1%, ist also bereits beträchtlich höher als die aus Milchsäure allein erhaltenen. Der Zusatz von Glucose begünstigt demnach die Assimilation der Milchsäure durch die Hefe.

I.

13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Erntehefe							Ausbeuten					
Trockensubstanz	Stickstoff	Eiweiß	Asche	Stickstoff	Eiweiß	Asche	Zuwachs an Hefetrockensubstanz je 100 g der angewandten Kohlenstoffquelle	Zuwachs an Eiweiß je 100 g der angewandten Kohlenstoffquelle	Zuwachs an organischen Stoffen je 100 g der angewandten Kohlenstoffquelle	Zuwachs an Hefetrockensubstanz je 100 g angewandten Kohlenstoffs	Zuwachs an organischen Stoffen je 100 g angewandten Kohlenstoffs	Versuch
g	%	%	%	g	g	g	g	g	g	g	g	Nr.
2,74	10,19	63,69	—	0,280	1,75	—	7,23	5,19	—	18,00	—	34
5,09	10,03	62,67	—	0,510	3,19	—	13,05	8,71	—	32,61	—	35
3,00	9,46	59,11	—	0,284	1,77	—	8,08	4,56	—	20,20	—	36
16,30	7,72	48,20	7,98	1,258	7,85	1,30	45,80	21,47	42,25	114,40	105,5	37
6,20	9,19	57,42	—	0,570	3,56	—	24,92	14,44	—	61,00	—	38
17,22	10,10	63,10	10,67	1,738	10,87	1,83	49,47	32,60	43,70	90,70	80,1	39
18,30	9,97	62,30	10,47	1,825	11,40	1,92	45,60	29,50	40,50	94,40	83,7	40
3,79	9,15	57,18	—	0,347	2,17	—	8,07	4,69	—	15,48	—	41
10,01	9,57	59,80	—	0,958	6,00	—	35,50	22,50	—	88,80	—	42
25,15	8,64	54,00	—	2,173	13,57	—	50,25	27,01	—	128,30	—	43
3,10	8,71	54,40	—	0,270	1,69	—	1,65	0,98	—	2,69	—	44
2,55	8,60	53,70	—	0,219	1,37	—	0,00	—	—	—	—	45
2,28	8,73	54,60	—	0,199	1,22	—	0,00	—	—	—	—	46
2,21	8,94	55,90	7,80	0,197	1,23	0,17	0,00	—	—	—	—	47
1,51	7,27	45,45	2,45	0,110	0,69	0,04	0,00	—	—	—	—	48
2,38	9,46	59,10	5,70	0,225	1,40	0,14	0,00	—	—	—	—	49
2,09	9,58	59,90	3,19	0,200	1,25	0,07	0,00	—	—	—	—	50
1,10	8,97	56,00	—	0,101	0,63	—	4,77*	4,63*	—	—	—	51

Versuch 38 wurde in $^1/_2$%iger *Brenztraubensäurelösung* durchgeführt. Es gelangten hierbei 19,6 g einer von der Firma *Schering* bezogenen Brenztraubensäure von sirupöser Konsistenz zur Anwendung. Die Nährsalzzusammensetzung war die gleiche wie bei den Versuchen mit Milchsäure. Der Zuwachs an Trockensubstanz betrug 4,88 g, das sind 24,92% der angewandten Brenztraubensäuremenge.

Versuch 39 wurde mit *Acetaldehyd* durchgeführt. Es kamen 26,0 g Acetaldehyd, Sp. 21°, „für wissenschaftliche Zwecke" (*Schering*), in $^1/_2$%iger Lösung zur Anwendung. Menge und Zusammensetzung der Nährsalze entsprach einem Versuch mit der gleichen Glucosemenge. Der Zuwachs an Hefetrockensubstanz war 7,84 g und entsprach einer Ausbeute von 49,47% der angewandten Aldehydmenge. Die Züchtung

verlief glatt. Die Hefe hatte dabei ein normales Aussehen. In der vorletzten Stunde der Züchtung war starker Essigsäuregeruch festzustellen, der jedoch gegen Ende des Versuchs wieder verschwand.

Bei einer Zusammensetzung der Nährlösung von 17,5 g Acetaldehyd und 13,0 g Glucose wurde jedoch nur eine Ausbeute von 45,60%, bezogen auf Acetaldehyd + Glucose, erhalten. Die Züchtung wurde mit Glucose allein begonnen. Erst nach 2 Stunden wurde auch mit dem Zulauf von Acetaldehyd eingesetzt. Auch hierbei verlief der Versuch glatt und gegen Ende der Züchtung trat ein deutlicher Essigsäuregeruch auf.

Es sei nochmals besonders erwähnt, daß die Aussaathefe für diese Versuche in einer Lösung von „Bergius-Holzzucker" herangezüchtet wurde, also nicht an Acetaldehyd angepaßt war.

Bei *Versuch 41* kamen 30,65 g *reiner Alkohol als alleinige Kohlenstoffquelle* zur Anwendung. Die hierbei erhaltene Ausbeute war sehr gering und betrug nur 8,07%. Es sei hier vorweggenommen, daß dieses Ergebnis in späteren, genau bilanzierten Versuchen ganz erheblich verbessert werden konnte.

Eine mit 20,0 g reinster *Essigsäure* (Eisessig) in fast 1%iger Lösung durchgeführte *Züchtung 42* führte zu einer Ausbeute von 35,50% der angewandten Essigsäuremenge. Auch hierbei war ein starker Anstieg des Eiweißgehalts in der Hefe festzustellen. Die Nährsalze bestanden wie bei den Versuchen mit Milchsäure aus primärem Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat und Ammoniak als Stickstoffquelle. Die Züchtung verlief glatt.

Versuch 43 wurde mit 1%iger *Glycerinlösung* angestellt. 41,0 g Glycerin waren die alleinige Kohlenstoffquelle. Die Züchtung verlief anfangs etwas zögernd, setzte nach $1^1/_2$ Stunden stärker ein und verlief dann ziemlich lebhaft. Der Zuwachs an Hefetrockensubstanz war 20,59 g, die Ausbeute 50,25% der angewandten Glycerinmenge.

Bei Verwendung von *Äthylacetal* konnte nur ein geringfügiger Hefezuwachs festgestellt werden. Er betrug auf 25,6 g nur 0,42 g, das sind 1,66%. Die Hefe zeigte im Versuchsverlauf ein normales Aussehen.

Völlig negativ verliefen die mit Äthylenglykol, Aceton, Methylalkohol, Formaldehyd, Formaldehyd + Glucose und *Ameisensäure* durchgeführten Versuche. An Stelle eines Zuwachses war eine Abnahme an Hefetrockensubstanz festzustellen. Mit Ausnahme von *Versuch 48 mit Ameisensäure* zeigte die Hefe jedoch stets im Verlauf der Züchtungen ein normales Aussehen. Auch die Zusammensetzung der Erntehefe unterschied sich nur wenig von der der Aussaathefe.

Auffallend war, daß auch *Versuch 50*, welcher in einer Lösung von *15,0 g Formaldehyd + 15,0 g Glucose* durchgeführt wurde, keinen Hefe-

zuwachs ergab. Die Hefe wies zwar im Versuchsverlauf keine Änderung im Aussehen auf, doch konnte keine Sprossung festgestellt werden. Die Anwesenheit von Formaldehyd wirkt hemmend auf das Wachstum der Hefe.

Versuch 51 wurde mit einer *1%igen Lösung von Formose* ausgeführt, welche durch Kondensation von Formaldehyd erhalten wurde[1].

75 ccm einer etwa 35%igen Formalinlösung wurden mit 1 bis 2 g metallischem Blei versetzt und nach dem Verdünnen auf etwa 1 Liter auf dem Wasserbad am Rückflußkühler auf etwa 90° C erwärmt. Nach etwa 9 Stunden trat eine geringe Gelbfärbung ein und die Lösung wies keinen Aldehydgeruch mehr auf. Die Flüssigkeit wurde filtriert und eingedampft. Der Rückstand wurde in einem Gemisch von Methyl- und Äthylalkohol gelöst und durch Äther gefällt und so von Bleisalzen befreit. Die filtrierte ätherische Lösung wurde bis zur Sirupdicke eingedampft und in Wasser auf 1 Liter gelöst. Nach *Kjeldahl-Bertrand* wurde darin der reduzierende Zucker bestimmt (berechnet als Glucose).

Eine 11,96 g reduzierenden Zucker (berechnet als Glucose) enthaltende Menge wurde nach Zugabe der üblichen Nährsalze als Nährsubstrat verwendet. Nach einer 6stündigen Züchtung konnte ein Hefetrockensubstanzzuwachs von 0,103 g festgestellt werden, das entspricht einer Ausbeute von 4,77% Hefe und 4,63% Eiweiß, bezogen auf die Reduktionsdifferenz. Im vergorenen Substrat waren noch 9,80 g reduzierender Zucker (als Glucose berechnet) vorhanden.

Die *Züchtungsdauer* der Versuche 34 bis 51 betrug im allgemeinen 8 Stunden. Bei Kohlenstoffquellen von stark saurem Charakter wurde der gesamte Stickstoff als Ammoniak und die erforderliche Phosphatmenge als primäres Kaliumphosphat zugegeben.

Die Versuche der Tabelle I sind jedoch nur als rein „qualitativ" zu bewerten und sollten in erster Linie zeigen, welche der angewandten Kohlenstoffquellen für die Bildung von Hefezellsubstanz verwertbar sind und somit an Stelle des Zuckers treten können.

Da von den angewandten Stoffen keine Bilanz vor und nach der Züchtung aufgestellt wurde, sondern der Zuwachs an Hefetrockensubstanz und Eiweiß lediglich auf die gesamte angewandte Menge bezogen wurde, geben diese Versuche noch keinen eindeutigen Aufschluß über die wirklichen Ausbeuten, bezogen auf verschwundenen Rohstoff.

B. Quantitative Versuche mit Stoffbilanz.

Zu diesem Zweck wurden nun von einigen Stoffen, welche in den Vorversuchen ein positives Ergebnis lieferten, *genau bilanzierte Züch-*

[1] *O. Loew*, Angew. Chem. **37**, 825, 1924; Chem. Centralbl. **1925**, I, 292; J. prakt. Chem. **33**, 829, 1886; Chem. Centralbl. **22**, 470, 1886; *E. Fischer*, ebenda **22**, 97 u. 359, 1886; *H. Vogel*, ebenda **1928**, I, 2327.

tungen unter Einhalten der Standardbedingungen vorgenommen, die also den Standardzüchtungen in reinen Zuckerlösungen entsprachen.

Als Kohlenstoffverbindungen kamen Milchsäure, 1,21, DAB. 6, mit und ohne Zusatz von Zucker, Brenztraubensäure, Äthylalkohol (Weingeist 96%), *Essigsäure* (Eisessig 99 bis 100%), *mit und ohne Zusatz von Zucker, zur Anwendung.*

Sämtliche Stoffe wurden von der Firma *Schering* bezogen. Züchtungsapparatur war die für die Standardversuche verwendete und bereits beschriebene. Hinsichtlich des Zulaufes und der Luftmengen wurden die gleichen Bedingungen wie für die Versuche mit 1%igen Zuckerlösungen eingehalten.

Es wurden bestimmt: Der Zuwachs an Hefetrockensubstanz, Eiweiß und organischen Stoffen, die Menge der gebildeten Kohlensäure und die in der vergorenen, hefefreien Flüssigkeit enthaltene restliche Kohlenstoffquelle, der gebildete Alkohol und der gesamte Reststickstoff sowie der organische Stickstoff.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in *Tabelle II* zusammengestellt. Es sind angeführt:

Tabelle

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
	Nährlösung				Aussaathefe							Erntehefe				
Versuch Nr.	Art der Kohlenstoffquelle	Angewandte Menge g	Konzentration %	Angewandte Stickstoffmenge (100% anorganisch) g	Trockensubstanz g	Stickstoff %	Eiweiß %	Asche %	Stickstoff g	Eiweiß g	Asche g	Trockensubstanz g	Stickstoff %	Eiweiß %	Asche %	Stickstoff g
52	Milchsäure	61,4	1	3,230	4,81	8,13	50,80	8,45	0,391	2,44	0,41	15,17	10,01	62,60	7,95	1,520
53	Milchsäure	64,2	1	3,518	4,91	8,42	52,60	8,70	0,414	2,58	0,43	7,82	9,51	59,50	7,05	0,745
54	Milchsäure	69,5	1	3,569	4,72	6,92	43,20	8,14	0,327	2,04	0,38	9,71	9,31	58,20	8,45	0,905
55	Milchsäure + Glucose	44,5 +35,0	1	3,615	4,82	7,74	48,40	8,08	0,373	2,33	0,39	43,93	8,76	54,80	9,07	3,850
56	Brenztraubensäure	53,26	1	2,048	3,36	7,14	44,60	8,16	0,239	1,49	0,27	6,31	8,87	55,45	2,47	0,560
57	Dasselbe	47,93	1	2,196	3,36	7,14	44,60	8,16	0,239	1,49	0,27	15,64	9,00	56,25	7,10	1,407
58	Äthylalkohol	56,05	1	3,199	4,94	7,50	46,90	6,60	0,370	2,32	0,33	37,02	9,25	57,80	8,91	3,425
59	Äthylalkohol	56,05	1	3,406	4,94	7,50	46,90	6,60	0,370	2,32	0,33	38,50	9,53	59,60	8,64	3,670
60	Essigsäure	72,31	1	2,720	4,81	8,00	50,00	7,58	0,385	2,40	0,36	31,75	9,41	58,80	8,40	2,988
61	Essigsäure	72,31	1	2,595	4,81	8,00	50,00	7,58	0,385	2,40	0,36	29,13	9,68	60,50	8,35	2,820
62	Essigsäure + Glucose	35,60 +35,00	1	2,932	4,87	7,30	45,60	7,26	0,356	2,22	0,35	38,95	7,94	49,60	9,00	3,090
63	Dasselbe	35,70 +35,00	1	3,176	4,87	7,30	45,60	7,26	0,356	2,22	0,35	39,40	8,43	52,70	8,21	3,320

* Zuwachs an Hefetrockensubstanz, Eiweiß bzw. organischen Stoffen aus 53,26 g Brenztraubensäure.

In Spalte 1 und 33 die Nummer des Versuchs.

„ „ 2— 4 die Art der Kohlenstoffquelle, die angewandte Menge und die Konzentration der Nährlösung.

„ „ 5 die angewandte Stickstoffmenge, welche zu 100 % aus anorganischem Stickstoff bestand.

„ „ 6—12 Trockensubstanz, Stickstoff, Eiweiß und Asche in der Aussaathefe in % bzw. g.

„ „ 13—19 Trockensubstanz, Stickstoff, Eiweiß und Asche der Erntehefe in % bzw. g.

„ „ 20—22 der gesamte Reststickstoff, der Rest der Kohlenstoffquelle und der gebildete Alkohol in der vergorenen Flüssigkeit in g.

„ „ 23 die Abweichung der Stickstoffbilanz in % des Gesamtstickstoffs (+ bzw. —).

„ „ 24—29 die Ausbeute an Hefetrockensubstanz, Eiweiß und organischen Stoffen in g, bezogen auf 100 g der verbrauchten Kohlenstoffquelle, auf 100 g der verbrauchten Kohlenstoffquelle—Alkohol bzw. auf 100 g der Kohlenstoffdifferenz.

„ „ 30—32 die ermittelte Kohlensäuremenge in g, sowie bezogen auf 100 g der verbrauchten Kohlenstoffquelle und auf 100 g Zuwachs an Hefetrockensubstanz.

II.

18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
		Vergorene hefefreie Flüssigkeit				Ausbeuten						Kohlensäure			
Eiweiß	Asche	Gesamter Reststickstoff	Rest der Kohlenstoffquelle	Gesamter Alkohol	Stickstoffbilanz	Zuwachs an Hefetrockensubstanz je 100 g der verbrauchten Kohlenstoffquelle	Zuwachs an Eiweiß je 100 g der verbrauchten Kohlenstoffquelle	Zuwachs an organischen Stoffen je 100 g der verbrauchten Kohlenstoffquelle	Zuwachs an Hefetrockensubstanz je 100 g (verbrauchte Kohlenstoffquelle — Alkohol)	Zuwachs an Hefetrockensubstanz je 100 g verbrauchten Kohlenstoff	Zuwachs an organischen Stoffen je 100 g verbrauchten Kohlenstoff	Gebildete Kohlensäuremenge	Kohlensäuremenge je 100 g der verbrauchten Kohlenstoffquelle	Kohlensäuremenge je 100 g Zuwachs an Hefetrockensubstanz	Versuch
g	g	g	g	g	%	g	g	g	g	g	g	g	g	g	Nr.
9,49	1,21	2,131	33,8	0,490	+ 0,8	37,60	25,60	34,7	38,81	94,0	86,8	19,00	69,0	183,5	52
4,65	0,55	3,175	55,8	0,382	− 0,3	34,75	24,76	33,3	38,15	87,0	83,2	14,50	173,0	499,0	53
5,65	0,82	2,970	56,1	0,162	− 0,5	37,20	26,93	34,1	38,23	93,5	85,5	16,50	123,0	330,0	54
4,10	3,98	0,101	Spuren	0,414	− 0,9	49,20	27,35	44,6	49,65	123,0	111,7	48,40	60,8	123,8	55
3,49	1,56	1,690	—	0,216	− 1,6	2,95*	2,00*	1,66*	—	—	—	13,63	—	461,0	56
8,80	1,11	1,001	4,99	0,390	− 1,1	28,60	17,03	26,7	29,10	70,0	65,2	—	—	—	57
1,42	3,30	0,127	11,57	—	− 0,5	72,20	43,00	65,5	—	138,0	125,2	22,50	50,7	70,1	58
2,93	3,32	0,134	3,50	—	+ 0,7	63,80	39,22	58,1	—	122,3	111,2	27,60	52,5	82,3	59
8,69	2,66	0,140	2,37	0,837	+ 0,7	38,55	23,30	35,3	39,15	96,3	88,2	59,50	85,0	220,8	60
7,62	2,43	0,137	3,34	0,415	− 0,8	35,30	22,10	32,3	35,55	88,2	80,7	—	—	—	61
9,34	3,50	0,163	3,92 (Essigs.)	0,458	− 1,0	50,90	25,60	46,4	51,90	127,8	115,8	46,20	69,3	135,5	62
0,78	3,23	0,175	1,50 (Essigs.)	0,460	− 1,0	49,90	26,80	45,8	50,50	124,5	114,2	45,50	65,8	132,0	63

1. Bilanzierte Versuche mit Milchsäure.

Bei *Versuch 52* kamen 61,4 g *Milchsäure* in 1%iger Lösung zur Anwendung. In der Nährlösung wurden 3,0 g primäres Kaliumphosphat und 1,5 g Magnesiumsulfat ($MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$) gelöst. 1,5 g Kaliumphosphat wurden zu Beginn der Züchtung vorgelegt und im weiteren Verlauf 560 ccm verdünnte Ammoniaklösung, entsprechend 3,230 g Stickstoff, zugefügt. Die Züchtungstemperatur betrug zu Beginn 32° C, später 27 und 28° C, und konnte nur durch mehrmaliges Erwärmen auf dieser Höhe gehalten werden. Der Züchtungsverlauf war glatt. Die Hefe zeigte normales Aussehen, jedoch nur mäßige Sprossung. Die Versuchsdauer betrug 8 Stunden. Es wurde ein Zuwachs von 10,36 g Hefetrockensubstanz und 7,05 g Eiweiß erzielt. Der Eiweißgehalt der Erntehefe war 62,60% (!) gegenüber einem solchen von 50,80% in der Aussaathefe. Von der Aussaathefe und der Erntehefe wurde nach *Silbereisen*[1] noch Hefegummi und Hefeglykogen bestimmt. In der Aussaathefe waren 12,72% Glykogen und 8,49% Hefegummi, zusammen 21,21%, in der Erntehefe 3,25% Glykogen und 7,69% Hefegummi, zusammen 10,94%, enthalten. Der Glykogengehalt der Erntehefe betrug demnach um 9,47% und der Hefegummigehalt um 0,80% weniger. Der Aschegehalt der Hefen war normal. In der vergorenen Flüssigkeit waren 33,8 g Milchsäure enthalten, ferner 0,490 g Alkohol[2], wovon 0,070 g in der Waschflasche nachgewiesen werden konnten, und 2,131 g gesamter Reststickstoff, welcher sich aus 2,083 g anorganischem und 0,048 g organischem Stickstoff zusammensetzt. Die Abweichung der Stickstoffbilanz betrug +0,8%.

Von den vorgelegten 61,4 g Milchsäure wurden in der vergorenen Flüssigkeit 33,8 g wiedergefunden, sodaß 27,6 g = 45% verbraucht wurden. Auf diese bezogen waren die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz 37,60% und an Eiweiß 25,60%. Es wurde also vorwiegend Eiweiß gebildet. Die Kohlendioxydmenge betrug 19,00 g.

In der salzsauren, vergorenen Flüssigkeit wurde mit 2, 4-Di-nitrophenylhydrazin ein gelber, flockiger Niederschlag erhalten, welcher nach einmaligem Umfällen einen Schmelzpunkt von 209° C (unkorrigiert) aufwies. Mit käuflicher Brenztraubensäure konnte ein entsprechender Niederschlag mit 2, 4-Di-nitro-phenylhydrazin erzielt werden, mit einem Schmelzpunkt von 212° C. Der unkorrigierte Mischschmelzpunkt beider betrug ebenfalls 212° C. Nach *Neuberg* weist das 2, 4-Di-nitro-phenylhydrazon der Brenztraubensäure einen Schmelzpunkt von 216° C auf.

[1] *K. Silbereisen*, Wochenschr. f. Brauerei **1935**, S. 146.

[2] Gemeint ist stets Rohalkohol, wie üblich quantitativ bestimmt nach der Destillation durch pyknometrische Ermittlung des spezifischen Gewichts und Auswertung desselben mittels Tabellen.

Es kann also angenommen werden, daß es sich um das Hydrazon der Brenztraubensäure handelt, welche durch Dehydrierung von Milchsäure gebildet wurde.

Ein Blindversuch mit einer Nährlösung von der gleichen Zusammensetzung wie in Versuch 52, jedoch ohne Hefezugabe, ergab nach 8stündiger Feinstbelüftung keinen Niederschlag mit 2, 4-Di-nitro-phenylhydrazin. Damit ist festgestellt, daß die Bildung von Brenztraubensäure allein auf die dehydrierende Tätigkeit der Hefezellen zurückzuführen ist.

Versuch 53 wurde mit 64,2 g *Milchsäure* in 1%iger Lösung ausgeführt. Die Nährsalze waren die gleichen wie bei Versuch 52. Im Verlauf der Züchtung wurden 610 ccm verdünnte Ammoniaklösung, entsprechend 3,518 g Stickstoff zugefügt. Die Züchtungstemperatur betrug zu Beginn 30,5° C, später 27 bis 28° C und mußte wie beim vorhergehenden Versuch durch mehrmaliges Erwärmen aufrechterhalten werden. Der Versuchsverlauf war normal; die Hefe wies ein normales Aussehen, jedoch nur geringe Sprossung auf. Die Züchtungsdauer war 8 Stunden. Der Zuwachs betrug 2,91 g Hefetrockensubstanz und 2,07 g Eiweiß. Der Eiweißgehalt der Erntehefe war 59,50% gegenüber 52,60% der Aussaathefe. An Kohlenhydraten waren in der Aussaathefe 11,20% Glykogen und 7,02% Hefegummi, zusammen 18,22% und in der Erntehefe 9,13% Glykogen und 3,69% Hefegummi, zusammen 12,82%, enthalten. Der Aschegehalt der Hefe lag in normalen Grenzen. Die vergorene Flüssigkeit enthielt 55,8 g Milchsäure, ferner 0,382 g Alkohol und 3,175 g gesamter Reststickstoff, wovon 3,155 g anorganischer Natur waren. Die Abweichung der Stickstoffbilanz betrug — 0,3%.

Von den angewandten 64,2 g Milchsäure wurden 55,8 g wiedergefunden, so daß nur 8,4 g, etwa 13%, verbraucht wurden. Auf diese Menge bezogen betrugen die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz 34,75% und an Eiweiß 24,76%. Auch hier wurde vorwiegend Eiweiß erzeugt. Die gebildete Kohlensäuremenge betrug 14,50 g.

Auch bei diesem Versuch wurde in der vergorenen Flüssigkeit mit 2, 4-Di-nitro-phenylhydrazin ein Niederschlag erhalten, und zwar nach einmaligem Umfällen 261 mg in 1 Liter, diese entsprechen in 9150 ccm vergorener Lösung 0,78 g Brenztraubensäure.

In *Versuch 54* kamen 69,5 g *Milchsäure* in 1%iger Lösung zur Anwendung. An Nährsalzen wurden die gleichen Mengen wie bei den beiden ersten Versuchen angewandt. Als Stickstoffquelle wurden 635 ccm verdünnte Ammoniaklösung, entsprechend 3,569 g Stickstoff, zugegeben. Die Versuchstemperatur war zu Beginn 32,5° C, im übrigen Verlauf zwischen 27 und 28° C und konnte auch hier nur durch mehrmaliges Erwärmen aufrechterhalten werden. Die Versuchsdauer betrug 8 Stunden. Es wurde ein Zuwachs von 4,99 g Trockensubstanz und von

3,61 g Eiweiß erzielt. Der Eiweißgehalt der Erntehefe war 58,20% gegenüber 43,20% in der Aussaathefe. In der vergorenen Flüssigkeit waren 56,1 g Milchsäure, 0,162 g Alkohol und 2,970 g gesamter Reststickstoff, wovon 2,913 g anorganisch waren, enthalten. Die Abweichung der Stickstoffbilanz betrug $-0{,}5\%$.

Von den angewandten 69,5 g Milchsäure wurden 13,4 g, etwa 19%, verbraucht. Auf diese bezogen betrugen die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz 37,20% und an Eiweiß 26,93%. Es wurden hierbei 16,50 g Kohlensäure gebildet.

In 1 Liter der vergorenen Flüssigkeiten konnten mit 2, 4-Di-nitrophenylhydrazin nach einmaliger Umfällung 0,339 g Hydrazon ausgefällt werden; diese entsprechen in 9,050 Liter vergorener Flüssigkeit 1,00 g Brenztraubensäure.

Bei *Versuch 55* kamen 44,5 g *Milchsäure und 35,0 g Glucose* zur Anwendung. Die Konzentration der Nährlösung war 1%, bezogen auf Milchsäure + Glucose. Im Nährsubstrat wurden 2,00 g Diammoniumphosphat, 1,70 g Ammoniumsulfat, 1,00 g Kaliumsulfat und 1,50 g Magnesiumsulfat gelöst. 2,30 g primäres Kaliumphosphat wurde zu Beginn der Züchtung vorgelegt. Die Anfangstemperatur betrug 30,0° C und im Laufe der Züchtung um 28° C. Während des Versuchs wurden 580 ccm verdünnte Ammoniaklösung zugegeben, entsprechend 2,830 g Stickstoff. Die Versuchsdauer betrug $8^1/_2$ Stunden. Es wurde ein Zuwachs von 39,11 g Trockensubstanz und 21,77 g Eiweiß erhalten. Der Eiweißgehalt der Aussaathefe betrug 48,40%, der der Erntehefe 54,80%. Der Gärverlauf war dem der Standardzüchtungen mit Zucker gleich.

In der vergorenen Flüssigkeit konnte weder Zucker noch Milchsäure nachgewiesen werden. Es waren 0,414 g Alkohol enthalten, wovon jedoch der größere Teil, nämlich 0,233 g, in der Waschflasche vorgefunden wurde. An gesamtem Stickstoff waren noch 0,101 g vorhanden, wovon 0,025 g anorganisch waren. Die Abweichung der Stickstoffbilanz betrug $-0{,}9\%$.

In dem vorliegenden Versuch wurden Milchsäure und Zucker restlos aufgebraucht und ergaben Ausbeuten von 49,2% Hefetrockensubstanz und 27,35% Eiweiß auf Glucose + Milchsäure bezogen. Wird für Glucose allein eine Ausbeute von 51% angenommen (= Mittelwert von den Ausbeuten aus 1%igen Zuckerlösungen der Standardversuche), so beträgt sie für Milchsäure allein 47,7%. Die Menge der gebildeten Kohlensäure war 48,40 g.

2. *Bilanzierte Versuche mit Brenztraubensäure.*

Bei *Versuch 56* wurde in einer Lösung, die 1% *Brenztraubensäure* enthielt, gezüchtet. Es kamen 53,26 g im Vakuum frisch destillierter Brenztraubensäure zur Anwendung. An Nährsalzen wurden dem

Substrat 2,20 g primäres Kaliumphosphat und 1,10 g Magnesiumsulfat zugesetzt. 1,10 g Kaliumphosphat wurden zu Beginn der Züchtung vorgelegt und im Verlauf derselben noch 420 ccm verdünnte Ammoniaklösung, entsprechend 2,048 g Stickstoff, zugegeben. Die Anfangstemperatur betrug 29,3° C und wurde im Verlaufe des Versuchs auf 28° C gehalten. Diese Temperatur konnte nur durch wiederholtes Anwärmen aufrechterhalten werden. Die Nährlösung wies eine stark saure Reaktion auf. Die Versuchsdauer betrug 9 Stunden. Es wurde ein Zuwachs von 2,95 g Hefetrockensubstanz und 2,00 g Eiweiß erhalten. Der Eiweißgehalt der Aussaathefe betrug 44,60%, der der Erntehefe 55,45%.

In der vergorenen Flüssigkeit waren 0,216 g Alkohol und 1,690 g Stickstoff, wovon 1,547 g anorganisch waren, enthalten. Die Abweichung der Stickstoffbilanz betrug $-1{,}6\%$. Die restliche Brenztraubensäure wurde nicht ermittelt. Es wurden 13,63 g Kohlensäure gebildet.

Versuch 57 wurde mit 47,93 g im Vakuum frisch destillierter *Brenztraubensäure* in 1%iger Lösung durchgeführt. In dem Nährsubstrat wurden 2,20 g primäres Kaliumphosphat und 1,10 g Magnesiumsulfat gelöst. 1,10 g Kaliumphosphat wurden zu Beginn der Züchtung vorgelegt, im weiteren Versuchsverlauf noch 450 ccm verd. Ammoniaklösung, entsprechend 2,196 g Stickstoff, zugegeben. Die Temperatur wurde durch wiederholtes Anwärmen zwischen 27 und 28° C gehalten und betrug zu Anfang 30,0° C. Die Nährlösung wies stark saure Reaktion auf. Die Versuchsdauer betrug $8^1/_2$ Stunden. Es wurde ein Zuwachs von 12,28 g Trockensubstanz und 7,30 g Eiweiß erhalten. Der Eiweißgehalt der Aussaathefe betrug 44,60%, der Erntehefe 56,25%.

In der vergorenen Flüssigkeit waren 4,99 g Brenztraubensäure, 0,390 g Alkohol und 1,001 g Reststickstoff, wovon 0,930 g auf anorganischen Stickstoff fielen, enthalten. Die Abweichung der Stickstoffbilanz betrug $-1{,}1\%$.

Von den angewandten 47,93 g Brenztraubensäure wurden 4,99 g in der vergorenen Flüssigkeit wiedergefunden und demnach 42,9 g = 89,8% verbraucht. Die auf diese Menge bezogenen Ausbeuten sind 28,60% Hefetrockensubstanz und 17,03% Eiweiß.

3. *Bilanzierte Versuche mit Äthylalkohol.*

Versuch 58 wurde in einer 1%igen Lösung von *Äthylalkohol*, insgesamt 56,05 g enthaltend, ausgeführt. An Nährsalzen wurden im Nährsubstrat 2,60 g Diammoniumphosphat, 2,00 g Kaliumsulfat und 1,50 g Magnesiumsulfat gelöst. 1,30 g Diammoniumphosphat wurden zu Versuchsbeginn vorgelegt. Die im Verlauf der Züchtung gebildete Säure wurde durch die Zugabe von 325 ccm verd. Ammoniaklösung,

entsprechend 1,673 g Stickstoff, neutralisiert. Die Temperatur betrug zu Beginn 30,0° C, im weiteren Züchtungsverlauf 28 bis 29° C. Um diese Temperatur aufrechtzuerhalten, mußte einigemale erwärmt werden. In der zweiten Hälfte der Versuchszeit wies das belüftete Substrat stark saure Reaktion auf; das p_H war 3,3. Die Dauer der Züchtung war $8^1/_2$ Stunden. Es wurde ein Zuwachs von 32,08 g Trockensubstanz und 19,10 g Eiweiß erzielt. Der Eiweißgehalt der Aussaathefe war 46,90%, der Erntehefe 57,80%.

Um die erhöhten Mengen an verdunstetem Alkohol abzufangen, wurden die Gärgase durch zwei in Eis gepackte Waschflaschen geleitet. In der vergorenen Flüssigkeit waren 11,24 g Alkohol, in der ersten Waschflasche 0,31 g und in der zweiten 0,02 g Alkohol, zusammen 11,57 g enthalten. Ferner wurden 0,127 g Reststickstoff ermittelt, wovon 0,091 g anorganisch waren. Die Abweichung der Stickstoffbilanz betrug $-0{,}5$%. Der Fettgehalt der Aussaat- und Erntehefe war 4,2 bzw. 5,7%.

Von den angewandten 56,05 g Alkohol wurden 44,48 g verbraucht, das sind etwa 80%. Die hierauf bezogenen Ausbeuten sind 72,20% Hefetrockensubstanz und 43,00% Eiweiß.

Die gebildete Kohlensäuremenge betrug 22,50 g. Unter der Annahme, daß die Kohlensäure durch direkte Verbrennung von Alkohol entstanden ist, würde dies einer Alkoholmenge von 11,77 g entsprechen. Diese Menge würde demnach für den Aufbau von Hefekörpersubstanz verlorengehen und nur zur Energiebeschaffung dienen. Es wären dementsprechend aus 44,48 g − 11,77 g = 32,71 g Alkohol 32,08 g Hefetrockensubstanz gebildet worden.

Die theoretische Hefeausbeute aus Alkohol dürfte jedoch noch höher liegen. Nach den einer späteren Veröffentlichung vorbehaltenen beiden Ausbeutegleichungen für Eiweiß bzw. stickstofffreie Stoffe würden für 32,08 g Hefetrockensubstanz mit 19,10 g Eiweiß und 9,98 g stickstoffreien Stoffen nur 28,58 g Alkohol nötig sein (unter gleichzeitiger Berücksichtigung des wieder ausgeschiedenen Eiweißes) oder aus 32,71 g Alkohol müßten theoretisch 36,2 g Hefetrockensubstanz erhalten werden, was einer Ausbeute von 110,5 g Hefetrockensubstanz aus 100 g Alkohol entspräche. Entsprechend dem höheren kalorischen Wert des Alkohols würden die theoretischen Ausbeuten rund das 1,9fache der aus Zucker erhaltenen betragen.

Versuch 59 wurde als Parallelversuch zu 58 mit der gleichen *Alkohol*menge und Nährsalzen angesetzt. Im Züchtungsverlauf wurden 365 ccm verdünnte Ammoniaklösung zugefügt, welche 1,880 g Stickstoff enthielten. Die Temperatur betrug zu Beginn 30,8° C, im weiteren Versuchsverlauf um 28° C und stieg ohne äußeres Zutun bis auf 30,3° C an. In der zweiten Hälfte wies das gärende Substrat eine stark saure

Reaktion auf. Das p_H war 4,3. Die Züchtungsdauer war $8^1/_2$ Stunden. Gegen Ende der Züchtung trat intensiver Ester- und Essigsäuregeruch auf. Der Zuwachs betrug 33,56 g Trockensubstanz mit 20,61 g Eiweiß. Der Eiweißgehalt der Aussaathefe war 46,90%, der Erntehefe 59,60%.

In dem vergorenen Substrat waren einschließlich der ersten Alkohol-waschflasche 3,45 g Alkohol, in der zweiten Waschflasche 0,05 g, zusammen 3,50 g Alkohol, enthalten, ferner 0,134 g Stickstoff, wovon 0,077 g anorganisch waren. Die Abweichung der Stickstoffbilanz war + 0,7%. Der Fettgehalt der Aussaathefe betrug 4,2%, der Erntehefe 5,9%.

Von den angewandten 56,05 g Alkohol wurden 52,55 g, das sind 94%, verbraucht. Die hierauf bezogenen Ausbeuten sind 63,80% Hefetrockensubstanz und 39,22% Eiweiß.

Es wurden 27,60 g Kohlensäure gebildet. Unter der gleichen Annahme wie bei Versuch 58 würde dies einer Alkoholmenge von 14,41 g entsprechen, welche wieder für den Aufbau von Hefezellsubstanz verlorengingen. Es wären demnach aus 52,55 g − 14,41 g = 38,14 g Alkohol 33,56 g Hefetrockensubstanz gebildet worden, ungeachtet der daneben noch entstandenen Produkte wie Essigsäure, Ester u. a. Auffallend bei diesem Versuch ist vor allem die Erhöhung der Temperatur des belüfteten Substrats ohne äußeren Einfluß, die der Erhöhung der Kohlensäuremenge gleichlief, so daß angenommen werden muß, daß durch die Hefe mehr Alkohol als bei Versuch 58 direkt verbrannt wurde.

4. Bilanzierte Versuche mit Essigsäure.

In *Versuch 60* kam eine 1%ige Lösung von *Essigsäure*, insgesamt 72,31 g Essigsäure, zur Anwendung. An Nährsalzen wurden im Nährsubstrat 3,0 primäres Kaliumphosphat und 1,5 g Magnesiumsulfat gelöst. 1,5 g Kaliumphosphat wurden zu Beginn vorgelegt. Durch Zugabe von 300 ccm verd. Ammoniaklösung wurde die vorgelegte Essigsäure fast neutralisiert. Im weiteren Gärverlauf wurden nochmals 255 ccm zugegeben, insgesamt also 555 ccm verd. Ammoniaklösung, entsprechend 2,720 g Stickstoff. Die Temperatur war zu Anfang 31,5° C, im weiteren Verlauf um 28° C. Zur Aufrechterhaltung der Temperatur war wiederholtes Anwärmen erforderlich. Die Reaktion des Substrats war meist schwach sauer bis neutral, teilweise sogar alkalisch, da offenbar, besonders zu Beginn der Züchtung, die Essigsäure sehr rasch assimiliert wird. In der zweiten Hälfte der Züchtung war das p_H 4,7. Gegen Ende der Züchtung war die Reaktion des Substrats neutral bis schwach alkalisch; es trat hierbei starker Schwefel-

wasserstoffgeruch auf. Die Züchtungsdauer war $8^1/_2$ Stunden. Der Zuwachs betrug 26,94 g Trockensubstanz und 16,29 g Eiweiß. Der Eiweißgehalt der Aussaathefe war 50,00%, der Erntehefe 58,80%.

In der vergorenen Flüssigkeit waren 2,37 g Essigsäure enthalten, die nach der von *G. Klein*[1] angegebenen Methode durch Destillation bestimmt wurde, ferner 0,837 g Alkohol, wovon 0,032 g in der Waschflasche enthalten waren, und 139,7 mg Reststickstoff mit 71,6 mg anorganischem Stickstoff. Die Abweichung der Stickstoffbilanz betrug + 0,7%.

Von den 72,31 g angewandter Essigsäure wurden 69,94 g verbraucht, das sind 96,6%. Die hierauf bezogenen Ausbeuten waren 38,55% Hefetrockensubstanz und 23,30% Eiweiß.

An Kohlensäure wurden 59,50 g gebildet. Wenn die Kohlensäure durch direkte Verbrennung von Essigsäure entstand, würde dies einer Essigsäuremenge von 40,60 g entsprechen, welche nur zur Energiebeschaffung dienten und so für den Aufbau von Hefezellsubstanz verlorengingen. Dementsprechend wären aus 69,94 g – 40,60 g = 29,34 g Essigsäure 26,94 g Hefetrockensubstanz gebildet worden, ungeachtet der noch auftretenden Nebenprodukte.

Versuch 61 wurde als Parallelversuch zu 60 mit gleichen Essigsäure- und Nährsalzmengen angesetzt. Zu Beginn der Züchtung wurden wiederum 300 ccm verdünnte Ammoniaklösung zugegeben, wodurch die vorgelegte Nährlösung annähernd neutralisiert wurde. Im weiteren Versuchsverlauf wurden noch 230 ccm, insgesamt 530 ccm verd. Ammoniaklösung zugegeben, welche 2,595 g Stickstoff entsprachen. Die Temperatur war zu Beginn 30,0° C und wurde dann um 28° C gehalten. Der Gärverlauf glich im wesentlichen dem des Versuchs 60. Die Reaktion des Substrats war zunächst schwach sauer bis neutral; in der zweiten Hälfte des Versuchs betrug das p_H 4,1. Gegen Ende der Züchtung wies das Substrat neutrale bis schwach alkalische Reaktion auf; es trat Schwefelwasserstoffgeruch auf. Die Züchtungsdauer betrug $8^1/_2$ Stunden. An Zuwachs konnten 24,32 g Trockensubstanz mit 15,21 g Eiweiß erzielt werden. Der Eiweißgehalt der Aussaathefe war 50,00%, der Erntehefe 60,50%.

In der vergorenen Flüssigkeit konnten 3,34 g Essigsäure, 0,415 g Alkohol, wovon 0,069 g in der Waschflasche enthalten waren, ferner 137 mg Reststickstoff mit 83 mg anorganischem Stickstoff nachgewiesen werden. Die Abweichung der Stickstoffbilanz betrug – 0,8%.

---

[1] *G. Klein*, „Handbuch der Pflanzenanalyse", 2. Bd., Spez. Anal., 1. Teil, S. 383.

Von den angewandten 72,31 g Essigsäure wurden 68,97 g verbraucht, das sind 95,3%. Die daraus erhaltenen Ausbeuten sind 35,30% Hefetrockensubstanz und 22,10% Eiweiß.

Als Kohlenstoffquelle für *Versuch 62* kamen 35,60 g Essigsäure und 35,00 g Glucose in 1%iger Lösung (bezogen auf das Gemisch) zur Anwendung. An Nährsalzen wurden dem Substrat 1,50 g Diammoniumphosphat, 1,50 g primäres Kaliumphosphat, 1,00 g Kaliumsulfat, 1,50 g Magnesiumsulfat und 1,70 g Ammoniumsulfat zugesetzt. 0,5 g Diammoniumphosphat und 0,8 g primäres Kaliumphosphat wurden zu Beginn der Züchtung vorgelegt. Von den 440 ccm verd. Ammoniaklösung, entsprechend 2,146 g Stickstoff, wurden 150 ccm zu Beginn zugegeben, der Rest im weiteren Züchtungsverlauf. Die Temperatur war zu Beginn der Züchtung 32,2° C und wurde dann um 28° C gehalten. Der Gärverlauf glich im wesentlichen dem der Standardversuche mit 1%igen Zuckerlösungen. Die Reaktion des Substrats war meist schwach sauer, gegen Ende der Züchtung neutral. Das p_H war um 5,1. Die Züchtung wurde nach 8 Stunden beendet. Es wurde ein Zuwachs von 34,08 g Trockensubstanz und 17,12 g Eiweiß erzielt. Der Eiweißgehalt stieg von 45,60% in der Aussaathefe auf 49,60% in der Erntehefe an.

In der vergorenen Flüssigkeit waren 3,92 g Essigsäure, 0,458 g Alkohol (hiervon 0,027 g in der Waschflasche) und 0,163 g Stickstoff enthalten, wovon 0,114 g anorganisch waren. Die Abweichung der Stickstoffbilanz war $-1{,}0\%$.

Von den angewandten 35,00 g Glucose und 35,60 g Essigsäure wurde der Zucker restlos, die Essigsäure zu 89% verbraucht. Die hierbei erhaltenen Ausbeuten sind, bezogen auf Glucose + Essigsäure, 50,90% Hefetrockensubstanz und 25,60% Eiweiß. Wenn die Ausbeute aus Glucose zu 51% Hefetrockensubstanz (= Mittelwert der 1%igen Glucose-Standardversuche) angenommen wird, beträgt sie auch aus Essigsäure 51,0%, ist also um etwa 13% höher als aus Essigsäure allein. — Die gebildete Kohlensäuremenge betrug hierbei 46,20 g.

Versuch 63 wurde als *Parallelzüchtung zu 62* mit 35,70 g *Essigsäure und* 35,00 g *Glucose* angesetzt. Es kamen die gleichen Nährsalzmengen zur Anwendung. An verdünnter Ammoniaklösung wurden insgesamt 490 ccm, = 2,390 g Stickstoff, zugegeben. Temperatur, Säuregrad des Substrats und Versuchsverlauf glichen denen des Versuchs 62. Die Gärdauer betrug $8^1/_2$ Stunden. Es waren 34,53 g Trockensubstanz und 18,56 g Eiweiß zugewachsen. Der Eiweißgehalt stieg von 45,60% in der Aussaathefe auf 52,70% in der Erntehefe an.

In der vergorenen Flüssigkeit waren 1,50 g Essigsäure, Spuren reduzierender Stoffe (Zucker), 0,460 g Alkohol, wovon 0,035 g aus der Waschflasche erhalten wurden, und 0,175 g Stickstoff mit 0,112 g an-

organischem Stickstoff enthalten. Die Abweichung der Stickstoffbilanz betrug $-1{,}0\%$.

Von den angewandten 35,00 g Glucose und 35,70 g Essigsäure wurde der Zucker nahezu restlos, die Essigsäure zu 96% verbraucht. Die auf Glucose + Essigsäure bezogenen Ausbeuten sind $49{,}90\%$ Hefetrockensubstanz und $26{,}80\%$ Eiweiß. Wenn die Ausbeute aus Glucose mit 51% angenommen wird, so wurden aus Essigsäure rund 49% Hefetrockensubstanz erhalten, also ebenfalls mehr als aus Essigsäure allein. An Kohlensäure wurden hierbei 45,50 g gebildet.

5. Vergleich der Ausbeuten.

Zum Vergleich der Ausbeuten an Hefetrockensubstanz aus den Versuchen der Tabelle II mit denen der Standardversuche in 1%igen Zuckerlösungen wurde der Zuwachs auch auf 100 g der Kohlenstoffdifferenz bezogen, berechnet aus der Menge der verbrauchten Kohlenstoffquelle. Bei den Züchtungen in 1%igen Zuckerlösungen betrug die Ausbeute bei 100 g Kohlenstoff im Mittel 127,5 g Hefetrockensubstanz, entsprechend 51% aus Zucker, in den Versuchen mit Milchsäure 94,0, 87,0 und 93,5 g, mit Milchsäure + Glucose 123,0 g, mit Brenztraubensäure 70,0 g, mit Alkohol 138,0 g und 122,3 g, mit Essigsäure 96,3 und 88,2 g und mit Essigsäure + Glucose 127,8 und 127,5 g. Bei dieser Ausbeutezusammenstellung bleibt allerdings der kalorische Wert der einzelnen Stoffe noch unberücksichtigt.

Durch den Zusatz von Zucker wurden die Ausbeuten aus Milchsäure und Essigsäure erheblich erhöht; dies dürfte letzten Endes auf die günstigeren energetischen Verhältnisse zurückzuführen sein.

Zusammenfassung.

Zusammenfassend ergibt sich aus den Versuchen 52 bis 63:

1. Milchsäure wird als alleinige Kohlenstoffquelle nur zum Teil aufgenommen und liefert niedrigere Ausbeuten als Glucose. Entsprechend dem niedrigeren kalorischen Wert der Milchsäure müßte das 0,97fache der Ausbeuten aus Zucker erhalten werden. Tatsächlich wurden aber nur das 0,74- bzw. 0,69fache gebildet.

2. Bei einem Zusatz der gleichen Menge Zucker wird Milchsäure restlos aufgenommen und dabei die Ausbeuten aus letzterer wesentlich erhöht. Wenn die Hefeausbeuten aus Zucker mit 51% angenommen wird, so ergibt sich eine solche von $47{,}7\%$ aus Milchsäure, demnach das 0,94fache.

3. Brenztraubensäure wird als alleinige Kohlenstoffquelle ebenfalls nur teilweise aufgenommen und die daraus erhaltenen Ausbeuten sind niedriger als aus Zucker.

4. Äthylalkohol wurde zu 80 und 94% verbraucht. Die Ausbeuten hieraus sind höher als aus Zucker. Entsprechend dem höheren kalorischen Wert des Alkohols müßten die Ausbeuten daraus um das 1,9fache höher liegen als aus Glucose. Tatsächlich wurde jedoch nur das 1,4- bzw. 1,25fache erhalten.

5. Essigsäure wurde zu 96,6 und 95,3% verbraucht. Die Ausbeuten hieraus sind niedriger als aus Zucker. Entsprechend dem niedrigeren kalorischen Wert der Essigsäure müßte das 0,97fache der Ausbeuten aus Zucker erhalten werden. Es wurde jedoch nur das 0,76- bzw. 0,69fache erreicht.

6. Bei Zusatz einer gleichen Menge Zucker zu Essigsäure wurden erheblich günstigere Ausbeuten erzielt. Die Essigsäure wurde dabei zu 89 und 96% verbraucht. Wenn die Ausbeuten an Hefetrockensubstanz aus Zucker mit 51% angenommen wird, so ergibt sich aus Essigsäure eine solche von 51 und 48,9%, also das 1,0- bzw. 0,96fache.

7. Die von der Hefe in den Versuchen 52 bis 63 im Züchtungsverlauf in das Substrat wieder ausgeschiedene organische Stickstoffmenge betrug im Mittel 3,4% der von ihr umgesetzten Stickstoffmenge.

Die Bestimmung von 0,3 bis 50 mg Glucose mit dem Verfahren von Hagedorn und Jensen.

Von

Alfred Zeller.

(Aus der Staatslehr- und Versuchsanstalt für Gartenbau, Hetzendorf-Schönbrunn, Wien.)

(Eingegangen am 26. November 1938.)

Das Verfahren, das *Hagedorn* und *Jensen*[1] seinerzeit für die Bestimmung des Blutzuckers angaben, fand in den letzten Jahren immer weitere Verbreitung — auch in botanischen Laboratorien — und ist heute wohl das beliebteste und am meisten angewandte Verfahren zur Bestimmung kleiner Mengen reduzierender Zucker. Ihm haften nur zwei kleine Unbequemlichkeiten an: Sein auf Mengen von 0,002 bis 0,385 mg Glucose beschränkter Anwendungsbereich und die Notwendigkeit, eine Tabelle für die Berechnung der Ergebnisse zu benutzen. In manchen Laboratorien hat man versucht, den Anwendungsbereich des Verfahrens zu vergrößern. So veröffentlichte *C. S. Hanes*[2] ein Verfahren zur Bestimmung von 0,2 bis 3,8 mg Glucose nach *Hagedorn-Jensen* und *Issekutz* und *Both*[3] ein solches für 1 bis 15 mg. Allen diesen Vorschriften ist gemeinsam, daß die Glucosemenge aus der Menge des reduzierten Kaliumferricyanids mit Hilfe einer Tabelle gefunden wird, da die Umsetzung nicht genau stöchiometrisch verläuft. Wir geben nun im folgenden eine Vorschrift, die sich im wesentlichen an die von *Issekutz* und *Both* anlehnt, aber Glucosemengen von 0,3 bis 14 mg und von 5 bis 50 mg zu bestimmen gestattet. Für den zuerst genannten Bereich wird eine m/10 Lösung von Kaliumferricyanid verwendet, für den zweiten m/4 Lösung. In beiden Fällen verlaufen die Umsetzungen nahezu vollständig stöchiometrisch, so daß bei Anwendung einfacher Umrechnungszahlen die Fehler nie mehr als 5% der bestimmten Zuckermenge betragen. Bei biologischen Untersuchungen wird diese Genauigkeit meist vollständig ausreichend sein, zumal sich Fehler von 5% nur in sehr ungünstigen Fällen ergeben; meist betragen sie weniger als 1%.

Vorschrift I. Bestimmung von 0,3 bis 14 mg Glucose.

Lösungen.

A. m/10 K_3FeCy_6, stark alkalisch: 32,9 g K_3FeCy_6 p. a. + 70,00 g Na_2CO_3 p. a. zu 1000 (dunkel aufbewahren; es ist vorteilhaft, die Lösung einige Tage altern zu lassen).

[1] Diese Zeitschr. **135**, 46, 1923. — [2] Biochem. J. **23**, 99, 1929. — [3] Diese Zeitschr. **183**, 298, 1927.

B. 10%ige (Vol.-%) Lösung von $ZnSO_4$ aqu. p. a.; vor Gebrauch zu je 30 ccm der Lösung 1 g KJ pp. (p. a. ist überflüssig) zusetzen. Bei niederen Temperaturen und Lichtabschluß einige Tage haltbar.

C. 10%ige Essigsäure.

D. 1%ige Stärkelösung (Amylum solubile, trocken, nach *Zulkowski*, in nicht über 70° warmes Wasser einrühren, mit einer Spur HgJ_2 konservieren.)

E. m/20 Thiosulfatlösung, mit 3 bis 5‰ Amylalkohol versetzt. (Dunkel aufbewahrte und nach *Mayr* und *Kirschbaum*[1] mit Amylalkohol vergiftete Thiosulfatlösungen auch geringer Konzentration halten sich praktisch unbegrenzt, mindestens aber 1 Jahr ohne ihren Titer zu ändern.) Einstellung gegen KJO_3, dessen Lösungen bekanntlich unbegrenzt haltbar sind.

Ausführung.

In ein trockenes Jenaer 50-ccm-Titrierkölbchen wird die Glucoselösung eingebracht und das Volumen auf 5 ccm ergänzt. Hierzu werden 5,00 ccm der Lösung A (entsprechend 10 ccm m/20 K_3FeCy_6) gegeben. Dann wird 15 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Erhitzen wird in kaltes Wasser gestellt.

Die *Titration* erfolgt nach 10 Minuten bis 6 Stunden. Hierzu:

1. In das Kölbchen einen solchen Überschuß von festem Kochsalz (pp., p. a. ist überflüssig) geben, daß die Lösung auch nach Zusatz der weiteren Lösungen gesättigt oder nahezu gesättigt ist; umschwenken.
2. Zusatz von 5 ccm gebrauchsfertiger Lösung B, gut umschwenken.
3. Zusatz von 5 ccm Lösung C, gut umschwenken.
4. Sofort mit m/20 Thiosulfat aus einer 10-ccm-Bürette, die 0,01 ccm abzulesen gestattet, titrieren; gegen Schluß Zusatz von 5 Tropfen Lösung D.

Blindbestimmungen zur Feststellung des Titers der Kaliumferricyanidlösung müssen täglich ausgeführt werden.

Das Wesentliche — und der Fortschritt gegen andere Abänderungen der *Hagedorn-Jensen*-Vorschrift — ist die Sättigung der Titrationsflüssigkeit mit Natriumchlorid *vor* dem Zusatz der Zinksulfat-Kaliumjodidlösung. Man erzielt dadurch einen vollkommen scharfen Umschlagspunkt ohne irgendein wesentliches Nachblauen der Lösungen und ohne daß — wie ohne oder bei ungenügendem NaCl-Zusatz — während des Titrierens am Niederschlag Jod adsorbiert würde, das sich nur langsam herauslöst und die Titration sehr verzögert. Titrationen, die mit zu geringem NaCl-Zusatz ausgeführt werden, dauern 20 Minuten und länger, ohne einen eindeutigen und endgültigen Umschlagspunkt zu ergeben. Bei Anwesenheit von genügend NaCl läßt sich die Titration ohne jede Verzögerung ausführen und die Blaufärbung, die erst nach etwa 10 bis 20 Minuten wieder auftritt, entspricht nicht mehr als 0,01 bis 0,02 ccm m/20 Thiosulfat. Parallelbestimmungen stimmen auch bei nicht ganz sorgfältiger Titration auf $\pm$ 0,01 bis 0,02 ccm m/20 Thiosulfat überein. Die NaCl-freie $ZnSO_4$-Lösung läßt sich viel leichter und bequemer herstellen und aufbewahren als eine Lösung mit hohem NaCl-Gehalt.

[1] *C. Mayr* u. *E. Kirschbaum*, Zeitschr. f. anal. Chem. **72**, 321, 1922.

Berechnung.

Zwischen 0,3 und 14 mg Glucose in 5 ccm angewandter Lösung entspricht 1 ccm m/20 K_3FeCy_6 1,42 mg Glucose. Nur bei Anwendung anderer Ausgangsvolumina ist eine Eichung des Verfahrens mit Glucoselösung bekannter Konzentration vorzunehmen.

Fehler.

Er beträgt unterhalb 1 mg höchstens 5 %, über 1 mg höchstens 1 % der bestimmten Glucosemengen.

Beleganalysen.

Glucose-einwaage mg	Verbrauch ccm m/20 K_3FeCy_6	Glucose berechnet	Differenz gegen Einwaage etwa %	Glucose-einwaage mg	Verbrauch ccm m/20 K_3FeCy_6	Glucose berechnet	Differenz gegen Einwaage etwa %
0,3	0,20	0,284	− 5	5,0	3,52	5,00	± 0
0,5	0,35	0,497	− 1	6,0	4,23	6,01	+ 0,2
1,0	0,69	0,980	− 2	8,0	5,61	7,98	− 0,2
2,0	1,41	2,00	± 0	10,0	7,09	10,08	+ 0,8
3,0	2,09	2,97	− 1	13,0	9,23	13,10	+ 0,8

Issekutz und *Both* (l. c.) fanden, daß die Umsetzung im *Hagedorn-Jensen*-Gemisch stark von der Alkalikonzentration abhängig ist. Sie haben ja aus diesem Grunde den Natrium-Carbonatgehalt der Kaliumferricyanidlösung für die Bestimmung von 1 bis 15 mg Glucose von 10,7 auf 70 g pro Liter erhöht. Wie unsere Versuche ergaben, lassen sich mit dieser Alkalikonzentration größere Zuckermengen auch bei Anwendung stärkerer Kaliumferricyanidkonzentrationen nicht ohne Verwendung einer Eichkurve bestimmen. Erhöhung der Natriumcarbonatkonzentration erweitert aber sofort den Anwendungsbereich des ganzen Verfahrens.

Vorschrift II. Bestimmung von 5 bis 50 mg Glucose.

Lösungen.

F. m/4 K_3FeCy_6, mit 120,00 g Na_2CO_3 im Liter. — G. 20 %ige (Vol.-%) Lösung von $ZnSO_4$ aqu. Vor Gebrauch auf je 10 ccm Lösung 0,8 g KJ zusetzen. — H. 20 %ige Essigsäure. — J. Wie Lösung D der Vorschrift I. — K. m/10 Thiosulfat mit 3 bis 5 ‰ Amylalkohol.

Ausführung.

In einen trockenen *Erlenmeyer*-Kolben von 200 ccm Inhalt wird die Glucoselösung eingebracht und das Volumen auf 10 ccm ergänzt. Hierzu kommen 10 ccm Lösung F. Dann wird 15 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt, abgekühlt und nach 10 Minuten bis 6 Stunden titriert.

Titrieren.

1. NaCl-Zusatz wie bei Vorschrift I.
2. Zusatz von 10 ccm gebrauchsfertiger Lösung G.
3. Zusatz von 10 ccm Lösung H. Gut umschwenken.
4. Sofort mit m/10 Thiosulfat titrieren. Die Bürette soll 25 ccm fassen und in $^1/_{20}$ geteilt sein, so daß man 0,01 ccm noch ablesen kann. Gegen Schluß Zusatz von 10 bis 15 Tropfen Lösung J.

Blindbestimmungen wie nach Vorschrift I. Vorsicht bei der Titration von Lösungen mit geringem Zuckergehalt. Diese Proben — und besonders auch die Blindwerte — werden beim Titrieren nicht weiß, sondern behalten einen schwach bläulichen Stich. Der Umschlagspunkt ist aber ganz scharf und schon bei geringer Übung nicht zu verkennen.

Berechnung.

1 ccm m/10 K_3FeCy_6 entspricht 2,275 mg Glucose.

Fehler.

Er beträgt zwischen 15 und 50 mg Glucose nicht über 0,3 % der Glucosemenge, zwischen 10 und 15 mg nicht über 1 %. Für Mengen unter 10 mg (bis etwa 0,5 mg) verwendet man besser eine Eichkurve, doch übersteigen bis zu 5 mg die Fehler bei Anwendung der angegebenen Umrechnungszahl 5 % nicht.

Beleganalysen.

Glucose-einwaage mg	Verbrauch ccm m/10 K_3FeCy_6	Glucose berechnet	Differenz gegen Einwaage etwa %	Glucose-einwaage mg	Verbrauch ccm m/10 K_3FeCy_6	Glucose berechnet	Differenz gegen Einwaage etwa %
5,0	2,11	4,80	− 5	25,0	10,98	24,95	− 0,2
10,0	4,36	9,90	− 1	35,0	15,44	35,10	+ 0,3
15,0	6,57	14,95	− 0,3	50,0	22,02	50,10	+ 0,2

Da sowohl bei Vorschrift I als auch bei Vorschrift II die Umrechnungszahl von der Alkalikonzentration abhängig ist, achte man auf genaue Einwaage des Alkalis und Einhaltung der vorgeschriebenen Endkonzentration von 20 bzw. 10 ccm bei der Wasserbadbehandlung. Abweichungen bis etwa 20 % des Endvolumens sind zulässig. Beide Verfahren haben sich bei tausenden von Zuckerbestimmungen bestens bewährt.

Eine Nährlösung zur physiologischen Regeneration von Mikroorganismen.

Von

Alfred Zeller.

(Staatslehr- und Versuchsanstalt für Gartenbau, Hetzendorf-Schönbrunn, Wien XII.)

(Eingegangen am 3. Dezember 1938.)

Es ist eine längst bekannte Tatsache, daß sich die physiologischen Eigenschaften der meisten Mikroorganismen bei längerer Kultur im Laboratorium verändern. Vielfach verschwindet gerade diejenige Fähigkeit der Mikroorganismen, derentwillen sie isoliert und kultiviert wurden. Man hat schon verschiedentlich versucht, Nährlösungen ausfindig zu machen, die derartige Degenerationen verhindern oder rückgängig machen sollen. Zuletzt haben *T. Chrzaszcz* und *M. Zakomorny*[1] über Versuche zur Regeneration physiologisch degenerierter Schimmelpilze berichtet und auch die ältere Literatur erwähnt, so daß wir unmittelbar an ihre Mitteilung anknüpfen können.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Fähigkeit von Bakterien, die Doppelbindungen von Ölsäure abzusättigen, die *J. Schönbrunner* ausführte und über die in kurzem berichtet werden wird, stellte es sich heraus, daß auch diese Fähigkeit verschiedenen Bakterienstämmen nach einiger Zeit zum Großteil verlorengeht. Wir haben nun zur Regeneration unserer Bakterienstämme folgende „Nährlösung x" hergestellt.

Etwa 100 Stück 4 Tage bei 26° im Dunkeln gewachsene Maiskeimlinge wurden von den Fruchtschalen befreit und mit Quarzsand ganz fein zerrieben; dazu kamen 100 g Kalbsleber und 100 g Kalbsherz, die durch eine Fleischmaschine getrieben und durch ein feines Haarsieb passiert worden waren. Außerdem wurden 100 g Hefe durch 48stündige Autolyse bei 50° C verflüssigt und zu dem Brei aus den Maiskeimlingen, Kalbsherz und Kalbsnieren zugesetzt. Die ganze Mischung wurde 2 Tage zur Autolyse bei etwa 10° aufbewahrt, wurde dann mit Leitungswasser auf etwa 1 Liter aufgefüllt und filtriert. Das schwach saure (p_H 6,0), fast klare Filtrat wurde mit Lauge auf ein p_H von etwa 7,5 eingestellt und durch ein steriles *Seitz*sches Entkeimungsfilter filtriert.

In gewöhnliche, hitzesterilisierte Fleischextrakt-Pepton-Bouillon-Röhrchen, die jedes 5 ccm Nährlösung enthielten, wurden nun mit steriler Pipette je 5 ccm obiger keimfrei filtrierten Lösung eingebracht. Das entstandene Gemisch diente uns als Regenerationslösung für unsere

[1] Diese Zeitschr. **291**, 312, 1937.

Bakterienstämme. Wir überimpften sie nach je 2 bis 3 Tagen auf frische „Nährlösung x" und prüften nach achtmaligem Überimpfen, also nach kaum 3 Wochen, das physiologische Verhalten der „regenerierten" Bakterien im Vergleich zu den normal weitergeführten Stammkulturen.

Nach vierwöchiger Bebrütung betrug die Zunahme der von uns untersuchten physiologischen Leistung der regenerierten Bakterienstämme im Vergleich zu den gleichzeitig untersuchten Stammkulturen[1]:

bei	Stamm	1	0 %
„	„	12	18 %
„	„	13	360 %
„	„	14	1500 %
„	Kultur	ϱ	320 %
„	„	φ	43 %
„	„	χ	17 %
„	„	ψ	65 %
„	„	ω	31 %

Diese ermutigenden Ergebnisse lassen hoffen, daß der eingeschlagene Weg — natürliche Ausgangsstoffe (wenn auch „unbekannter Zusammensetzung"), Kaltsterilisation, Zusatz einer gewöhnlichen Nährlösung — richtig ist und daß man auf diese Weise Nährlösungen herstellen kann, in denen die physiologische Regeneration von Mikroorganismen beschleunigt vor sich geht. Je nach der Art der zu regenerierenden Organismen muß man natürlich die Zusammensetzung der verwendeten Nährstofflösung (in unserem Fall Fleischextrakt-Pepton) verschieden wählen.

Da wir vorläufig die Versuche zur Erprobung unserer „Nährlösung x" nicht fortführen können, haben wir unsere vorerst ziemlich unvollständigen Befunde mitgeteilt, damit auch andere Laboratorien die Möglichkeit haben, unsere Nährlösung auszuprobieren.

[1] Die angeführten Belegversuche wurden von *J. Schönbrunner* im Laboratorium des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Wien ausgeführt und werden in seiner Dissertation ausführlicher mitgeteilt.

Zur Biochemie der Torula utilis.

II. Mitteilung:

Über die Zusammensetzung der Hefesubstanz, insbesondere des Hefeeiweißes.

Von

Hermann Fink und **Felix Just.**

(Aus dem Institut für Gärungsgewerbe und Stärkefabrikation an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 3. Dezember 1938.)

In unserer ersten Mitteilung[1] haben wir schon näher darauf hingewiesen, daß die biologischen Verhältnisse für die technisch erzeugten Futterhefen im Vergleich zu anderen Hefen, wie sie in den Gärungsgewerben, z. B. bei der Bier- und Weinbereitung und vor allem bei der Preßhefefabrikation, anfallen, stark abweichend sind. Die Vermutung, daß sich deshalb die Hefesubstanz als solche sowie auch das biochemische Verhalten unserer Torulahefen in mehr oder weniger wichtigen Merkmalen von den schon gut bekannten Kulturhefen unterscheiden, ist naheliegend. Bestärkt wurden wir durch die kürzliche Auffindung[1] des Dulcits in Holzzuckerhefe. Wir sind der Meinung, daß sich bei systematischer Untersuchung noch andere Unterschiede aufdecken lassen werden.

In der vorliegenden Arbeit beschäftigen wir uns mit der Zusammensetzung der Hefesubstanz, insbesondere des Hefeeiweißes. Die Kenntnis von der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung ist einmal von *theoretischem* Interesse, weil das gewonnene Zahlenmaterial die notwendige Grundlage für die Auffindung der Gesetzmäßigkeiten bei der Hefezüchtung — z. B. für die Energie- und Stoffbilanzen, Berechnung der praktischen und möglichen Ausbeuten usw.[2] — bilden. Außerdem lag uns aber daran, die praktisch wichtige Frage nach der *Vollwertigkeit* der technisch erzeugten Torulahefen als *Eiweißfuttermittel* methodisch unabhängig von den durchgeführten Fütterungsversuchen[3] zu klären. Durch einen Vergleich mit der Bierhefe, deren hoher Futterwert zweifelsohne feststeht, läßt sich die Frage einwandfrei entscheiden.

---

[1] *H. Fink* u. *F. Just*, diese Zeitschr. **296**, 306, 1938. — [2] *H. Fink* u. *J. Krebs*, diese Zeitschr. **299**, 1, 1938. — [3] *K. Richter* u. *H. Brüggemann*, Biedermanns Zentralbl. Agrik.-Chem. ration. Landwirtschaftsbetr. Abt. B.: Tierernährung **9**, 95, 1937.

Durch die Untersuchungen von *R. Schröder*[1], *J. Meisenheimer*[2] und von *H. Kraut* und *F. Schlottmann*[3] kennen wir den durchschnittlichen Gehalt des Eiweißes von Bierhefe an den lebenswichtigen Aminosäuren. Die mitgeteilten Ergebnisse weichen je nach der benutzten Arbeitsweise voneinander ab. Um eine tatsächliche Vergleichbarkeit des Zahlenmaterials zu garantieren, hielten wir uns absichtlich mit möglichster Treue an die Analysenmethoden und sonstigen Vorschriften, die *H. Kraut* und *F. Schlottmann*[3] in ihrer Arbeit angeben. Eine Beschreibung können wir uns also zur Vermeidung unnötiger Wiederholungen ersparen, indem wir auf jene Arbeit nochmals ausdrücklich verweisen. Zur Bestimmung des Hefegummis und Glykogens verwandten wir die von *Stockhausen* und *Silbereisen*[4] beschriebene Methode. Das „Rohfett" bestimmten wir durch erschöpfende Extraktion einer zusammen mit Quarzsand in der Kugelmühle staubfrei zerriebenen Hefeprobe.

Unsere Untersuchungsergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt. Die analysierten Proben waren sämtlich Torulahefen, die in den folgenden Nährlösungen mit sonst nur mineralischen Zusätzen nach dem Lüftungsverfahren gezüchtet worden waren:

Probe I in Alkohol als einziger C-Quelle[5].
Probe II in *Bergius*-Holzzucker.
Probe III in *Tornesch*-Holzzucker nach *Scholler*.
Probe IV in Sulfitablauge (in unserem Laboratorium gezüchtet).
Probe V ebenfalls eine „Sulfitablauge"-Hefe, die uns freundlicherweise von Herrn Kollegen *Richter*, Kraftborn, überlassen wurde[6]. Die Untersuchung dieser Probe war insofern von Interesse, weil damit ausgedehnte Fütterungsversuche ausgeführt worden sind[7].

In den letzten beiden Spalten der Tabelle wiederholen wir die von *Kraut* und *Schlottmann* (l. c.) gefundenen Analysenwerte der *Bierhefe*.

Wir sehen also, daß der *Stickstoffgehalt unserer Torulahefen I bis IV sogar etwas höher liegt als bei der Bierhefe, ebenso der Rohproteinwert* ($N \cdot 6{,}25$). Hefe V fällt heraus; ihr Stickstoffgehalt liegt mit 6,51% um 0,7%, ihr Rohproteingehalt mit 45,3% um etwa 5% niedriger.

Der Wert für das „*Rohfett*" — worunter wir, wie schon erwähnt, die ätherlösliche Substanz verstehen — liegt bei Hefe IV mit fast 6% verhältnismäßig hoch. Dieser Feststellung ist aber unseres Erachtens

[1] Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 389, 1902. — [2] Zeitschr. f. physiol. Chem. **104**, 229, 1919; **114**, 205, 1921. — [3] Diese Zeitschr. **291**, 406, 1937. — [4] Wochenschr. f. Brauerei **52**, 145, 1935. — [5] *H. Fink, J. Krebs* u. *R. Lechner*, diese Zeitschr. **290**, 135, 447, 1937; ebenda **300**, 59, 1938. — [6] Wofür wir auch an dieser Stelle bestens danken. — [7] *K. Richter-Kraftborn*, Privatmitteilung.

Tabelle I.

	Probe I %	Probe II %	Probe III %	Probe IV %	Probe V %	Bierhefe nach *Kraut* %
Trocknungsverlust	13,43	9,64	11,81	11,05	8,88	8,5—9,8
Gesamt-N	7,59	7,64	7,59	7,26	6,51	7,2—7,3
Gesamt-N in der Trockensubstanz	8,77	8,46	8,61	8,22	7,25	—
Rohprotein in der Trockensubstanz	54,8	52,9	53,8	51,4	45,3	49,9—50,5
Rohfett in der Trockensubstanz	2,46	2,70	—	5,95	1,68	—
Kohlenhydrat (Glykogen + Gummi) in der Trockensubstanz	13,8	13,7	16,5	16,4	11,8	—
Glykogen in der Trockensubstanz	5,0	4,9	6,8	7,1	4,6	—
Hefegummi in der Trockensubstanz	8,8	8,8	9,7	9,3	7,2	—
Glührückstand in der Trockensubstanz	11,16	8,13	8,71	9,06	12,20	—
P_2O_5 in der Trockensubstanz	5,56	4,79	4,86	5,05	5,75	1,6—1,9
P_2O_5 in % der Asche	49,8	58,9	55,8	55,7	47,2	—
Restsubstanz in der Trockensubstanz	17,7	22,5	21,0	17,2	29,0	—
Verbrennungswert g cal in der Trockensubstanz	4808	4915	5066	4889	4639	—

nicht allzu große Bedeutung beizumessen, weil das „Rohfett" nicht genügend genau definiert ist. Außerdem kommt noch hinzu, daß bei der Züchtung zur Verminderung des mitunter sehr starken und störenden Schäumens ziemlich beträchtliche Mengen (1 bis 5% bezogen auf Hefetrockensubstanz) Gärfett zugesetzt werden. Der größte Teil dieses zugesetzten Gärfettes wird augenscheinlich durch den Luftsauerstoff verändert und setzt sich an der Wandung des Züchtungsgefäßes ab. Ein Teil sowohl des veränderten wie auch des zugesetzten Gärfettes wird natürlich auch von der Hefe adsorbiert werden. Aus diesen Gründen ist der „Rohfett"-Wert mehr oder weniger zufällig.

Der Gehalt der Torulahefen I bis V an Kohlenhydraten — worunter wir die Summe von *Hefegummi* und *Hefeglykogen* verstehen — liegt zwischen 12 und 16%. Zum Vergleich seien die Werte von einigen anderen Hefen angeführt. *Stockhausen* und *Silbereisen* (l. c.) fanden bei:

verschiedenen untergärigen Hefen ..... 9 bis 11,5 % Kohlenhydrat
obergäriger Brauereihefe (Rasse 1205) ..... 19 % „
Weinhefen ..... 11,5 bis 24 „
Bäckereihefe M ..... 13 % „

In bezug auf den Kohlenhydratgehalt sind unsere Torulahefen also der Rasse M am ähnlichsten. Die Übereinstimmung geht noch weiter, wenn man das Verhältnis Hefegummi zu Hefeglykogen betrachtet.

Auch bei der Rasse M ist der Hefegummiwert etwa doppelt so groß wie der des Hefeglykogens, während bei den ober- und untergärigen Bierhefen das Verhältnis gerade umgekehrt ist.

Der *Glührückstand* (*Asche*) erreicht bei der Hefe V den ziemlich hohen Wert von mehr als 12%. Der niedrigste Wert von 8,1% bei Hefe II fällt jedoch mit dem der Bierhefe zusammen, den wir zu 8,07% bestimmt haben. Auffällig abweichend ist *der hohe P_2O_5-Gehalt der Torulahefen, der mit 4,8 bis 5,8% etwa dreimal so groß wie bei Bierhefe ist*[1]. Eine Bestätigung findet hierbei die für die praktische Berechnung der Nährsalzzusätze angewendete Faustregel, nach der der Phosphatgehalt (P_2O_5) etwa gleich der Hälfte des Glührückstandes sein soll. Bei unseren Hefen macht der P_2O_5-Gehalt 47% bis 59% des Glührückstandes aus.

Addiert man nun die prozentischen Werte der Hauptsubstanzen, nämlich Rohprotein, Rohfett, Kohlenhydrate und Asche, so erhält man bei weitem nicht 100%. Die Differenz ist oben als „*Restsubstanz*" in der Tabelle angeführt. Sie liegt bei den Hefen I bis IV zwischen 17 und 22%. Die Hefe V fällt mit fast 30% auch hierbei wieder heraus. Die chemische Natur dieser mengenmäßig sehr beträchtlichen Restsubstanz ist noch ungeklärt. Sicherlich besteht sie in der Hauptsache aus Cellulose (Rohfaser?). Auch Hemicellulosen dürften eine Rolle spielen. Wir beabsichtigen, uns in unseren folgenden Arbeiten damit zu beschäftigen.

In der folgenden Tabelle II sind die Werte der *van Slyke-Eiweißanalyse* eingetragen. (Alle Zahlen bedeuten % des Gesamt-N.)

Eine ausführliche Diskussion erübrigt sich. Hinzuweisen wäre nur auf die Tatsache, daß der Huminstickstoff mit 5,6 bis 5,9% verhältnismäßig hoch ist. Die Hydrolysenzeiten bei dem Aufschluß mit 20%iger Salzsäure wurden mit 120 bis 140 Stunden im Vergleich zu dem drei- bis viertägigen Kochen, das beim Aufschluß von *Kraut* (l. c.) ausreichte, beträchtlich überschritten. Daraus muß geschlossen werden, daß unsere Torulahefen schwieriger zu hydrolysieren sind als Bierhefe.

Beim Vergleich der Analysenwerte unserer Torulahefen mit denen der von *Kraut* untersuchten Bierhefen muß festgestellt werden, daß *die Zusammensetzung des Eiweißes der verschiedenen Hefen in guter Übereinstimmung ist.* Damit ist auch gezeigt, daß die technisch erzeugten Torulahefen als Futtermittel der Bierhefe von diesem Gesichtspunkt aus betrachtet nicht nachstehen. Die Ergebnisse der Fütterungsversuche werden also bestätigt. Natürlich bezieht sich diese Feststellung vorläufig nicht auf den Stoffwechsel höherer Ordnung. Unsere Versuchsergebnisse machen keine Aussage über Vitamingehalt und das Vorhandensein von anderen notwendigen Wirkstoffen.

[1] Dieser Tatbestand wird zurzeit eingehender untersucht.

Tabelle II.

	Probe I %	Probe II %	Probe III %	Probe IV %	Probe V %	Bierhefe, Durchschnittswert nach *Kraut* %	Bierhefe, wahrscheinlichste Werte nach *Kraut* %
Humin-N	5,91	5,60	5,73	5,71	5,62	3—4	—
Ammoniak-N	12,75	12,28	12,46	12,55	16,05	16,0	—
Gesamt-N der Basenlösung	28,13	29,46	28,49	27,93	24,42	25—29	—
Amino-N der Basenlösung	17,34	18,10	15,63	16,42	14,28	15—16	—
Nicht-Amino-N der Basenlösung	10,79	11,36	12,86	11,51	10,14	9,6—12,6	—
Arginin	11,23	10,92	11,31	12,07	10,77	11 —11,8	11
Histidin	4,06	5,26	5,94	3,93	3,67	2,3—5,9	3
Lysin	11,75	11,60	9,70	10,48	8,14	10,0	11
Cystin	1,62	1,71	1,58	1,48	1,67	1,5—1,6	1,6
Gesamt-N des Basenfiltrats	52,36	51,18	52,72	52,96	53,66	53—54	—
Amino-N des Basenfiltrats	47,50	46,03	47,95	48,86	49,31	48,4—49,3	—
Nicht-Amino-N des Basenfiltrats	4,86	5,15	4,77	4,10	4,35	4,5— 4,7	
Tryptophan	1,34	1,35	1,22	1,26	1,36	0,9	0,9
Tyrosin	2,50	2,93	2,74	3,35	3,39	2,5	2,5

Zusammenfassung.

Wir beschäftigten uns in der vorliegenden Arbeit mit der Zusammensetzung der Hefesubstanz von technisch gezüchteten Torulahefen. Untersucht wurden fünf verschiedene Hefen: Eine „Alkoholhefe", zwei Holzzuckerhefen, zwei Sulfitablaugehefen.

Bestimmt wurde: Rohprotein, Rohfett, Hefegummi und Glykogen, Glührückstand, Phosphatgehalt, Restsubstanz und kalorischer Verbrennungswert. Auf die festgestellten Unterschiede wurde hingewiesen.

Das Hefeeiweiß wurde nach der Methode von *van Slyke* analysiert.

Dabei konnte festgestellt werden, daß unsere Torulahefen ganz ähnlich wie die von *Kraut* und *Schlottmann* eingehend analysierten Bierhefen zusammengesetzt sind. Damit wurden auch auf diesem Wege die Ergebnisse der Fütterungsversuche bestätigt. Die technisch erzeugten Torulahefen sind also hinsichtlich der Zusammensetzung in ihrem Wert als Futtermittel der Bierhefe mindestens ebenbürtig.